



# Traitement du foisonnement filamentueux induit par *Microthrix parvicella* par ajout de sels métalliques : impact sur les boues activées

Nadège Durban

## ► To cite this version:

Nadège Durban. Traitement du foisonnement filamentueux induit par *Microthrix parvicella* par ajout de sels métalliques : impact sur les boues activées. Autre. AgroParisTech, 2015. Français. NNT : 2015AGPT0030 . tel-01316617

**HAL Id: tel-01316617**

**<https://pastel.archives-ouvertes.fr/tel-01316617>**

Submitted on 17 May 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## Doctorat ParisTech

### T H È S E

pour obtenir le grade de docteur délivré par

**L'Institut des Sciences et Industries  
du Vivant et de l'Environnement**

**(AgroParisTech)**

**Spécialité :**

**Sciences de l'eau**

*présentée et soutenue publiquement par*

**Nadège DURBAN**

Le 29 mai 2015

## **Traitement du foisonnement filamentueux induit par *Microthrix parvicella* par ajout de sels métalliques : impact sur les boues activées**

Directrice de thèse : **Sylvie Gillot**

Co-encadrante de thèse : **Lauriane Juzan**

### **Jury**

**M. Etienne PAUL**, Professeur, INSA de Toulouse

**M. Jean-Philippe STEYER**, Directeur de recherche, INRA Narbonne

**M. Sébastien LACROIX**, Docteur en microbiologie, Veolia Recherche et Innovation

**M. Alain BERMOND**, Professeur AgroParisTech

**Mme Sylvie GILLOT**, Directrice de Recherche, Irstea Lyon-Villeurbanne

Rapporteur

Rapporteur et Président du jury

Examineur

Invité

Directrice de thèse

Irstea

**Hydrosystèmes et bioprocédés (HBAN) – équipe TED-E - EPURE**

1 rue Pierre-Gilles de Gennes - CS 10030 92761 - Antony Cedex



## Résumé

L'ajout de sels métalliques dans les stations d'épuration à boues activées faible charge est proposé pour le contrôle d'un développement excessif de bactéries filamenteuses, notamment lorsqu'il s'agit de *Microthrix parvicella*.

L'objectif de ce travail a été d'évaluer l'efficacité de ce type de traitement lors d'épisodes de foisonnement des boues. Il s'agissait d'étudier l'impact de l'ajout d'aluminium sur les conditions de décantation, sur les performances de traitement et sur les micro-organismes des boues activées, notamment la spécificité du traitement vis-à-vis de *Microthrix parvicella*.

D'après l'enquête réalisée sur un échantillon de 370 stations d'épuration à boues activées faible charge, les problèmes de décantation demeurent une problématique majeure pour 30 % des installations de taille inférieure à 250 000 EH, et pour 50 % de celles traitant plus de 250 000 EH. Au moins un dysfonctionnement sur trois serait dû à un développement excessif de bactéries filamenteuses. Un taux de charge organique élevé a été identifié comme l'un des facteurs favorisant les dysfonctionnements. L'ajout de sels métalliques pour éliminer le phosphore des eaux usées contribue quant à lui à diminuer l'occurrence des dysfonctionnements, sachant que des sels de fer sont majoritairement utilisés.

Les mesures réalisées sur le pilote semi-industriel (1 500 EH) durant deux périodes de 6 mois ont confirmé l'efficacité des sels d'aluminium pour contrôler la capacité de décantation des boues activées, limiter les pertes de boues et la formation de flottants, pouvant entraîner une altération des rendements épuratoires. La confrontation de résultats issus de différents outils du génie des procédés (étude des performances épuratoires de l'installation, modélisation du fonctionnement du pilote), de la microbiologie et de la biologie moléculaire (microscopie, qPCR, DGGE, inventaire moléculaire) a permis de mieux comprendre les phénomènes observés. L'ajout de sels métalliques contribue à rendre *Microthrix parvicella* moins compétitif que les autres bactéries pour des concentrations supérieures à 0,7 mmol (g MVS)<sup>-1</sup> dans les liqueurs mixtes. Cette limitation de croissance s'ajoute à la formation d'agrégats biologiques denses, plus aptes à décanter, à l'internalisation des bactéries filamenteuses et leur disparition du liquide interstitiel. Lorsque la concentration obtenue dans la liqueur mixte est inférieure à 0,7 mmol (g MVS)<sup>-1</sup>, la formation de mousses est limitée et l'indice de boues est stabilisé, grâce à des phénomènes de coagulation qui n'impactent pas significativement la morphologie des agrégats ni l'abondance de *M. parvicella*.

D'après ces éléments, les mécanismes impliqués dans l'amélioration des conditions de décantation s'apparentent à des mécanismes non spécifiques de coagulation-floculation.

La modélisation des phénomènes observés, en incluant notamment une biomasse supplémentaire représentant *Microthrix parvicella* dans les modèles biocinétiques disponibles, permettrait sans doute de mieux comprendre les phénomènes de compétition entre les bactéries filamenteuses et les bactéries du floc.

**Mot clefs :** Boues activées, *Microthrix parvicella*, sels métalliques, aluminium, dysfonctionnements biologiques.



## Abstrat

Addition of metallic salts has been proposed to control the proliferation of *Microthrix parvicella* in low-loaded wastewater treatment plants (WWTP).

The work presented in this document aimed at evaluating the efficiency of such treatment in the control of bulking events. The impact of aluminium addition on the activated sludge settling properties, on the process performance and on the microorganisms presents in the activated sludge, particularly its specificity for *M. parvicella*, was assessed.

According to the survey performed on a sample of 370 low-loaded activated sludge WWTPs, settling problems remain a key issue for 30 % of WWTPs treating less than 250 000 p.e., and for 50 % of those treating more than 250 000 p.e.. In at least one case out of three, settling problems were induced by excessive development of filamentous bacteria. A high organic load was identified to be one of the factors favouring those dysfunctions. Metallic salts added to remove phosphorous from wastewater was also shown to reduce the occurrence of observed settling problems, given that iron salts are mostly utilised.

Measurements performed on the semi-industrial pilot plant (1 500 p.e.) confirmed the efficiency of aluminium salt addition in controlling the settling properties, reducing sludge loss and foaming formation which could degrade the WWTP removal efficiency. The confrontation of the results obtained via process engineering tools (study of the pilot plant removal efficiencies, plant modelling), microbiology and molecular microbiology (microscopy, quantitative PCR, DGGE, molecular inventory) allowed a better understanding of the observed phenomena. The aluminium salt addition contributes to make *M. parvicella* less competitive than the other bacteria when the aluminium concentration is above  $0.7 \text{ mmol (g MLVSS)}^{-1}$  in mixed liquor. This growth limitation is concomitant to the formation of more compact aggregates, with better settling properties, the embedment of filamentous bacteria into the flocs and therefore their disappearance from the interstitial liquid. When the aluminium concentration in the mixed liquor is below  $0.7 \text{ mmol (g MLVSS)}^{-1}$ , the foam formation is limited and the sludge volume index is stabilised thanks to coagulation phenomena which does not impact significantly the aggregates morphologies and *M. parvicella*'s relative abundance.

Based upon these results, the mechanisms involved in the improvement of the settling conditions are similar to non-specific mechanisms of coagulation-flocculation.

Modelling the observed behaviour, adding a biomass representing *M. parvicella* in available biokinetic models, would allow a better understanding of the competition between filamentous and flocculated bacteria.

**Keys words:** Activated sludge, *M. parvicella*, metallic salt, aluminium, biological dysfunction.

## Remerciements

Cette thèse s'est déroulée dans l'unité Hydrosystèmes et Bioprocédés (HBAN) de l'Institut national de recherche en science et technologies pour l'environnement et l'agriculture (Irstea) d'Antony. Je remercie Didier PONT, directeur régional du centre Irstea d'Antony et directeur de l'unité de recherche HBAN, de m'avoir accueillie au sein de ces structures.

Je remercie vivement les membres de mon jury de thèse. Je remercie tout d'abord Monsieur Jean-Philippe STEYER d'avoir présidé ce jury et d'avoir rapporté mon travail de recherche. Je remercie Monsieur Etienne PAUL pour avoir également rapporté ce travail ainsi que Monsieur Sébastien LACROIX pour l'avoir examiné. Je remercie aussi Monsieur Alain BERMOND pour ses commentaires lors de la soutenance mais également pour son suivi tout au long de la thèse en tant que professeur référent auprès de l'école doctorale ABIES. Je leur adresse mes remerciements pour les échanges et les commentaires lors de la soutenance qui ont d'approfondir les discussions relatives à ces travaux de recherche.

J'adresse toute ma gratitude à ma Directrice de thèse Sylvie GILLOT. Je la remercie vivement pour son encadrement scientifique et pour sa patience malgré la distance et les difficultés rencontrées. Je remercie également Lauriane JUZAN pour son co-encadrement lors de la thèse et pour m'avoir fait découvrir *Microthrix parvicella* dès mon stage de fin d'étude en 2011.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à Alexis DAUNAY, Franck LANGLET et Nicolas SOYER qui ont travaillé sur le hall expérimental du PILBIO ainsi qu'à Jean KRIER, Didier LETALLEC et Roger NICOL pour leurs commentaires lors des différents comités. J'adresse de même mes remerciements au groupe OTV de Veolia et au groupe Degrémont de Suez-Environnement qui ont contribué au financement de ce projet. Je remercie également Imène ESTEVE et Sébastien CHARRON de m'avoir accueillie à l'Institut de Minéralogie, de Physique des Matériaux et de Cosmochimie (IMPMC) de Jussieu.

J'adresse des remerciements très chaleureux à l'ensemble de l'équipe EPURE dont la bonne humeur quotidienne et l'écoute ont rendu le climat d'Île-de-France moins gris. Je remercie également tous ceux que j'ai côtoyés au laboratoire de microbiologie pour leurs conseils qui n'ont pas seulement été scientifiques. J'adresse également des pensées chaleureuses aux autres membres de l'unité d'HBAN notamment pour leurs accueils matinaux près de la machine à café et de ces sièges si confortable, ainsi qu'à Adrien P. pour sa patience. Je remercie plus particulièrement ceux qui, au fil du temps, sont devenus plus que des collègues, Ahlem, Anne, Céline, David, Marina, Nathalie, Oliviers, Pierrot ..., les réguliers du café au bureau 123 et du *Friday Drink* après un *Ton air de Brest*, j'espère que nous pourrions goûter ensemble « La STEP qui mousse ».

Je termine ces remerciements en les adressant à ceux sans qui je n'aurai jamais pu aller jusqu'au bout de cette aventure, soit ma famille, mes amis, Nantais, Toulousains, Poitevins ... et surtout à Valentin qui était prêt à me suivre partout sauf en Île-de-France mais qui l'a fait malgré tout.

Un grand merci à tous.



# Sommaire

<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE .....</b>	<b>1</b>
------------------------------------	----------

<b>CHAPITRE I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>5</b>
---------------------------------------------------	----------

<b>I.1. PROCÉDÉ DE TRAITEMENT DES EAUX USÉES PAR VOIE BIOLOGIQUE .....</b>	<b>6</b>
I.1.1. LES STATIONS D'ÉPURATION EN FRANCE.....	6
I.1.2. PRINCIPE DES STATIONS D'ÉPURATION À BOUES ACTIVÉES TRÈS FAIBLE CHARGE.....	8
I.1.3. LES BIOMASSES ÉPURATRICES .....	9
<b>I.2. LES AGRÉGATS BIOLOGIQUES DES BOUES ACTIVÉES.....</b>	<b>18</b>
I.2.1. CARACTÉRISATION DES AGRÉGATS BIOLOGIQUES .....	18
I.2.2. COHÉSION DES AGRÉGATS BIOLOGIQUES .....	19
<b>I.3. LES DYSFONCTIONNEMENTS BIOLOGIQUES DUS À UNE PROLIFÉRATION EXCESSIVE DE BACTÉRIES FILAMENTEUSES</b>	<b>22</b>
I.3.1. DESCRIPTION DES DYSFONCTIONNEMENTS OBSERVÉS .....	22
I.3.2. OCCURRENCE DES DYSFONCTIONNEMENTS EN FRANCE ET IDENTIFICATION DES BACTÉRIES FILAMENTEUSES IMPLIQUÉES .....	24
I.3.3. CAUSES POTENTIELLES DES DYSFONCTIONNEMENTS BIOLOGIQUES ET RECOMMANDATIONS POUR LIMITER LEUR OCCURRENCE.....	25
<b>I.4. TECHNIQUES DE LUTTE CONTRE LE DÉVELOPPEMENT EXCESSIF DES BACTÉRIES FILAMENTEUSES .....</b>	<b>27</b>
I.4.1. UNE SOLUTION PRÉVENTIVE : LA ZONE DE CONTACT .....	27
I.4.2. DIFFÉRENTS TRAITEMENTS CURATIFS .....	28
<b>I.5. CONCLUSIONS ET OBJECTIF DE L'ÉTUDE .....</b>	<b>35</b>

<b>CHAPITRE II. MATÉRIEL ET MÉTHODE .....</b>	<b>37</b>
-----------------------------------------------	-----------

<b>II.1. MISE EN PLACE D'UNE ENQUÊTE NATIONALE SUR LES DYSFONCTIONNEMENTS BIOLOGIQUES DES STATIONS D'ÉPURATION À BOUES ACTIVÉES .....</b>	<b>38</b>
II.1.1. DÉFINITION DE LA TAILLE DE L'ÉCHANTILLON .....	38
II.1.2. MÉTHODE D'ÉCHANTILLONNAGE .....	39
II.1.3. QUESTIONNAIRE .....	44
II.1.4. COLLECTE DES DONNÉES.....	45
II.1.5. ANALYSES STATISTIQUES.....	45
<b>II.2. MESURES RÉALISÉES SUR LE PILOTE SEMI-INDUSTRIEL .....</b>	<b>46</b>
II.2.1. LE PILOTE.....	46
II.2.2. DÉROULEMENT DES ESSAIS .....	47
II.2.3. MESURES RÉALISÉES .....	50
<b>II.3. ANALYSE DU FONCTIONNEMENT DU PILOTE .....</b>	<b>53</b>
II.3.1. PROCÉDURE D'ANALYSE DES DONNÉES .....	53
II.3.2. BILANS HYDRAULIQUE ET MASSIQUES .....	55
II.3.3. CHARGE MASSIQUE, ÂGE DE BOUES ET PERFORMANCE ÉPURATOIRE .....	56
II.3.1. QUANTITÉ MAXIMALE DE PHOSPHORE À PRÉCIPITER PAR VOIE PHYSICO-CHIMIQUE .....	56
<b>II.4. MODÉLISATION DYNAMIQUE DU FONCTIONNEMENT DU PILOTE .....</b>	<b>57</b>
II.4.1. CALAGE ET VALIDATION DES DONNÉES .....	59
<b>II.5. OBSERVATIONS MICROSCOPIQUES.....</b>	<b>60</b>
II.5.1. MICROSCOPIE CLASSIQUE .....	60
II.5.2. L'HYBRIDATION <i>IN SITU</i> DE SONDAS FLUORESCENTES (FISH) .....	61
II.5.3. MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE À BALAYAGE.....	62
<b>II.6. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE .....</b>	<b>63</b>

II.6.1.	EXTRACTION DE L'ADN GÉNOMIQUE.....	63
II.6.2.	SUIVI DE POPULATIONS PAR PCR QUANTITATIVE .....	63
II.6.3.	ÉTUDE DE LA BIODIVERSITÉ PAR ÉLECTROPHORÈSE EN GRADIENT DE GEL DÉNATURANT (DGGE) .....	65
II.6.4.	INVENTAIRE MOLÉCULAIRE.....	67

### **CHAPITRE III. OCCURRENCE DES DYSFONCTIONNEMENTS BIOLOGIQUES ET ÉTAT DES LIEUX DES TRAITEMENTS CURATIFS EN FRANCE..... 70**

III.1.	CARACTÉRISTIQUES DES INSTALLATIONS ÉCHANTILLONNÉES .....	71
III.1.1.	TRAITEMENT DE L'AZOTE .....	72
III.1.2.	TRAITEMENT DU PHOSPHORE .....	72
III.1.3.	TAUX DE CHARGE HYDRAULIQUE ET ORGANIQUE.....	73
III.1.4.	CHARGE MASSIQUE ET ÂGE DE BOUES .....	74
III.1.5.	SUIVI DE LA DÉCANTATION .....	74
III.2.	OCCURRENCE DES DYSFONCTIONNEMENTS BIOLOGIQUES .....	75
III.2.1.	OCCURRENCE DES DYSFONCTIONNEMENTS BIOLOGIQUES SUR LA STRATE 5 .....	76
III.2.2.	DYSFONCTIONNEMENTS BIOLOGIQUES AVÉRÉS.....	77
III.2.3.	SYNTHÈSE SUR L'OCCURRENCE DES DYSFONCTIONNEMENTS .....	78
III.3.	LIENS ENTRE L'OCCURRENCE DES DYSFONCTIONNEMENTS ET LE FONCTIONNEMENT DES INSTALLATIONS .....	78
III.3.1.	OCCURRENCE DES DYSFONCTIONNEMENTS SELON LE MODE DE TRAITEMENT DU PHOSPHORE .....	79
III.3.2.	OCCURRENCE DES DYSFONCTIONNEMENTS SELON LE TAUX DE CHARGE HYDRAULIQUE ET ORGANIQUE DE LA STATION .....	80
III.4.	FACTEURS À L'ORIGINE DES DYSFONCTIONNEMENTS.....	81
III.5.	MESURES MISES EN ŒUVRE POUR LUTTER CONTRE LES DYSFONCTIONNEMENTS .....	81
III.6.	CONCLUSIONS .....	85

### **CHAPITRE IV. CONSOLIDATION DES DONNÉES REQUISES POUR L'ANALYSE DU FONCTIONNEMENT DU PILOTE ET LE SUIVI QUANTITATIF DES BIOMASSES ..... 86**

IV.1.	CONDITION DES MESURES .....	87
IV.2.	CARACTÉRISATION DU FONCTIONNEMENT DU PILOTE .....	89
IV.2.1.	CONSOLIDATION DES DONNÉES .....	89
IV.2.2.	ANALYSE DES DONNÉES DE FONCTIONNEMENT DU PILOTE.....	96
IV.2.3.	MODÉLISATION DU FONCTIONNEMENT DU PILOTE POUR LE SUIVI $AlCl_3$ .....	107
IV.2.4.	CONCLUSIONS .....	112
IV.3.	INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS OBTENUS EN PCR QUANTITATIVE .....	113
IV.3.1.	VARIABILITÉ DUE À L'EXTRACTION DE L'ADN GÉNOMIQUE .....	113
IV.3.2.	QUANTIFICATION DES POPULATIONS D'INTÉRÊT .....	114
IV.3.1.	CONCLUSIONS .....	118

### **CHAPITRE V. CONTRÔLE DES DYSFONCTIONNEMENTS BIOLOGIQUES DUS À *M. PARVICELLA* PAR AJOUT DE SELS MÉTALLIQUES.....120**

V.1.	IMPACT DES SELS MÉTALLIQUES SUR LE FONCTIONNEMENT DU PILOTE .....	121
V.1.1.	CONDITIONS DE DÉCANTATION ET MOUSSAGE .....	121
V.1.2.	RENDEMENTS D'ÉPURATION .....	123
V.2.	IMPACT DES SELS MÉTALLIQUES SUR LES BACTÉRIES FILAMENTEUSES ET LES AGRÉGATS BIOLOGIQUES.....	129
V.2.1.	ÉVOLUTION DE L'ABONDANCE RELATIVE DES BACTÉRIES FILAMENTEUSES ET DE LA MORPHOLOGIE DES AGRÉGATS BIOLOGIQUES .....	129
V.2.2.	IMPACT DE L'ALUMINIUM SUR LA MORPHOLOGIE DES BACTÉRIES FILAMENTEUSES .....	136

<b>V.3. IMPACT DES SELS MÉTALLIQUES SUR LES POPULATIONS MICROBIENNES DES BOUES ACTIVÉES.....</b>	<b>139</b>
V.3.1. IMPACT DES SELS MÉTALLIQUES SUR LA DIVERSITÉ DES POPULATIONS MICROBIENNES .....	139
V.3.2. QUANTIFICATION DES MICROORGANISMES D'INTÉRÊT PAR QPCR.....	143
 <b>CONCLUSION GÉNÉRALE.....</b>	<b>154</b>
 <b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>158</b>
 <b>ANNEXES.....</b>	<b>170</b>

## Liste des figures

Figure I-1 : Répartition des stations à boues activées selon leur domaine de charge .....	6
Figure I-2 : Répartition des stations à boues activées faible charge et aération prolongée selon la charge maximale traitée .....	7
Figure I-3 : Répartition des stations à boues activées faible charge selon les départements métropolitains français.....	7
Figure I-4 : Principe de fonctionnement d'une station d'épuration à boues activées .....	8
Figure I-5 : Arbre phylogénétique des bactéries nitrosantes (AOB) basé sur les séquences d'ADNr 16S .....	11
Figure I-6 : Arbre phylogénétique des bactéries nitrifiantes (NOB) basé sur les séquences d'ADNr 16S .....	11
Figure I-7 : Réactions biochimiques simplifiées pour une bactérie déphosphatante .....	13
Figure I-8 : Morphologie de <i>M. parvicella</i> .....	14
Figure I-9 : Schéma du métabolisme de <i>M. parvicella</i> .....	15
Figure I-10 : Évolution du taux de croissance maximal de <i>M. parvicella</i> ( $\mu_{max}$ ) en fonction de la température ..	16
Figure I-11 : Représentation de la variation saisonnière de l'affinité pour les lipides de <i>M. parvicella</i> et des bactéries hétérotrophes .....	16
Figure I-12 : Variation de la morphologie générale des agrégats biologiques en fonction de l'âge des boues et de la charge massique .....	18
Figure I-13 : Synthèse des interactions pouvant intervenir dans la stabilisation des flocs.....	20
Figure I-14 : interactions entre les constituants des boues et les cations divalents – Modèle d'Higgins et Novak (1997). .....	20
Figure I-15 : Composition et organisation de la paroi des bactéries Gram positives et Gram négatives .....	21
Figure I-17 : Observations microscopiques en contraste de phase d'un agrégat biologique normal (a) et d'un agrégat biologique diffus (b) – Schématisation d'un agrégat biologique normal (c) et diffus (d) .....	23
Figure I-18 : Schéma de principe de la zone de contact .....	27
Figure I-19 : Diagramme de solubilité du fer (Fe) (a) et de l'aluminium (Al) (b) en fonction du pH .....	30
Figure I-20 : Observation MEB – mise en évidence de l'effet flocculant des cations trivalents .....	30
Figure I-21 : Mécanismes potentiels impliqués dans le contrôle du foisonnement de <i>M. parvicella</i> par ajout de sels d'aluminium d'après la littérature .....	34
Figure II-1 : Principe de la stratification avec allocation proportionnelle .....	39
Figure II-2 : Taux de stations par département de l'échantillon retenu .....	42
Figure II-3 : Répartition des stations d'épuration du parc épuratoire français et de l'échantillon.....	43
Figure II-4 : Enchaînement logique du questionnaire envoyé aux exploitants de stations d'épuration .....	44
Figure II-5 : Schéma du pilote.....	46
Figure II-6 : Variation du débit d'alimentation journalier .....	47
Figure II-7 : Procédure d'analyse des données – adaptée de Rieger et al. (2013).....	53
Figure II-8 : Etapes de calibration du modèle - adaptées de Rieger et al. (2013).....	59
Figure II-9 : Etapes du traitement bio-informatique des données issues de l'inventaire ADNr 16S .....	68
Figure III-1 : Répartition des stations en fonction des modes de traitement de l'azote .....	72
Figure III-2 : Répartition des stations en fonction des différents modes de traitement du phosphore .....	72

Figure III-3 : Répartition de l'utilisation des sels métalliques pour le traitement du phosphore .....	73
Figure III-4 : Différents protocoles mis en œuvre pour la mesure de la capacité des boues à décanter .....	75
Figure III-5 : Pourcentage de stations ayant rencontré un dysfonctionnement du type décantation et/ou moussage .....	76
Figure III-6 : Occurrence des dysfonctionnements biologiques avérés .....	77
Figure III-7 : Distribution du taux de dysfonctionnements selon le procédé de traitement du phosphore - Strate 5 exclue .....	79
Figure III-8 : Distribution du taux de dysfonctionnements suivant le taux de charge organique - Strate 5 exclue .....	80
Figure IV-1 : Dose d'aluminium ajoutée rapportée à la masse de MES dans le pilote – Suivi $AlCl_3$ .....	87
Figure IV-2 : Dose en sels métalliques ajoutés rapportée à la masse de MES dans le système – Suivi $Al-Fe-Cl_3$ .....	88
Figure IV-3. Bilan hydraulique : écart entre les débits entrants et sortants du système biologique .....	89
Figure IV-4. : Extrait des distributions obtenues pour les données de concentrations après décantation primaire pour les deux séries de mesures .....	90
Figure IV-5. Relation entre les concentrations en aluminium dans l'eau décantée et les concentrations en phosphore particulaire (a - Suivi $AlCl_3$ ) et en MMS (b - Suivi $Al-Fe-Cl_3$ ) .....	93
Figure IV-6 : Evolution de la concentration en fer au cours du temps dans l'eau décantée – suivi $Al-Fe-Cl_3$ .....	93
Figure IV-7. Concentration en aluminium en fonction des matières minérales en suspension (MMS) pour les différentes phases du suivi $AlCl_3$ .....	94
Figure IV-8 : Concentration en aluminium estimée et mesurée pour le suivi $AlCl_3$ (a) et $Al-Fe-Cl_3$ – Concentration en fer estimées et mesurée pour le suivi $Al-Fe-Cl_3$ (b) .....	95
Figure IV-9 : Variations du débit d'alimentation et de la conductivité des eaux brutes – .....	97
Figure IV-10 : Histogramme des débits journaliers – .....	98
Figure IV-11 : Variation de la charge en DCOt, en MES et en $DBO_5$ pour le suivi $AlCl_3$ (a) et le suivi $Al-Fe-Cl_3$ (c) ainsi qu'en NTK et en Pt pour le suivi $AlCl_3$ (b) et le suivi $Al-Fe-Cl_3$ (d) .....	100
Figure IV-12 : Charges journalières ramenées à l'équivalent habitant a) suivi $AlCl_3$ et b) suivi $Al-Fe-Cl_3$ .....	101
Figure IV-13 : Masse de MVS et MES dans le système (a et c) et flux en MES extrait (b et d) pour le suivi $AlCl_3$ (a et b) et $Al-Fe-Cl_3$ (c et d) .....	103
Figure IV-14 : Évolution du ratio MVS/MES et MMS/MES pour le suivi $AlCl_3$ (a) et $Al-Fe-Cl_3$ (b) .....	105
Figure IV-15 : Concentration en aluminium et en fer rapportée à la concentration en MVS dans les liqueurs mixtes pour le suivi $AlCl_3$ (a) et $Al-Fe-Cl_3$ (b) .....	106
Figure IV-16 : Concentrations en MES et MVS mesurées et modélisées dans les liqueurs mixtes (LM) .....	109
Figure IV-17 : Evolution des concentrations en $NH_4$ (a) et $NO_x$ (b) mesurées et modélisées dans l'effluent .....	110
Figure IV-18 : Evolution des concentrations en $PO_4$ (a) et Pt (b) mesurées et modélisées dans l'effluent .....	111
Figure IV-19 : Concentrations en aluminium mesurées, estimées et modélisées dans les liqueurs mixtes .....	112
Figure IV-20 : Les différentes étapes de la quantification des gènes d'intérêt - du prélèvement à l'analyse qPCR .....	115
Figure IV-21 : Concentration (a) et proportion (b) de <i>M. parvicella</i> et des bactéries totales par qPCR – suivi $AlCl_3$ .....	117
Figure V-1 : Distribution de la température sur le bassin C2 et de l'indice de boues suivant les différentes phases des suivis $AlCl_3$ et $Al-Fe-Cl_3$ (valeur moyenne indiquée en bleu pour chaque phase) .....	121
Figure V-2 : Pente de l'IB calculée sur sept jours en fonction de la quantité de sels métalliques ajoutée rapportée à la masse en MES dans le système .....	122



<i>Figure V-3 : Flux de MES dans les boues racless et dans l'effluent (a et c) et évolution du rendement d'abattement des MES en fonction du ratio <math>[Me]_{LM} / [MVS]</math> (b et c) pour le suivi <math>AlCl_3</math> (a et b) et <math>Al-Fe-Cl_3</math> (c et d)</i>	124
<i>Figure V-4: Rendement d'abattement du phosphore en fonction du temps (a et c) et en fonction de la dose de sels métalliques appliquée <math>[Al]_{LM} / [MVS]</math> (b et d)</i>	126
<i>Figure V-5 : Rendements d'abattement des différents paramètres d'intérêt pour le suivi <math>AlCl_3</math> (a) et <math>Al-Fe-Cl_3</math> (b)</i>	128
<i>Figure V-6 : Evolution de la morphologie des agrégats biologiques et de la présence de bactéries filamenteuses dans le liquide interstitiel – Observation en contraste de phase</i>	132
<i>Figure V-7 : Observations microscopiques en FISH des bactéries filamenteuses des boues activées</i>	133
<i>Figure V-8 : Observations en MEB des agrégats biologiques des boues activées</i>	136
<i>Figure V-9 : Observation en MEB-EDX des agrégats biologiques des boues activées–</i>	137
<i>Figure V-10 : Observations en MEB et analyses EDX des bactéries filamenteuses d'un même champ</i>	138
<i>Figure V-11 : Distribution taxonomique suivant les différents phylums majeurs</i>	140
<i>Figure V-12 : Distribution taxonomique du phylum des Actinobacteria (a) et des Protobacteria (b)</i>	141
<i>Figure V-13 : Gel DGGE avec calcul de dendrogramme par comparaison des bandes</i>	142
<i>Figure V-14 : Quantification des microorganismes d'intérêt pour le suivi <math>AlCl_3</math></i>	143
<i>Figure V-15 : Quantification des microorganismes d'intérêt pour le suivi <math>Al-Fe-Cl_3</math></i>	144
<i>Figure V-16 : Modélisation de la biomasse totale (<math>XH + XA + XPAO</math>), autotrophe (<math>XA</math>) et déphosphatante (<math>XPAO</math>)</i>	145
<i>Figure V-17 : Comparaison des productions de bactéries totales par qPCR et par modélisation</i>	146
<i>Figure V-18 : Production de bactéries totales déterminée par modélisation (a) et par qPCR (b)</i>	147
<i>Figure V-19 : Production de biomasse déphosphatante (a) et autotrophe (b) selon les données de quantification - Suivi <math>AlCl_3</math></i>	148
<i>Figure V-20 : Abondance relative de <i>M. parvicella</i>, des AOB et des PAO (a) et Production de biomasse correspondant à <i>M. parvicella</i> - Suivi <math>AlCl_3</math></i>	149
<i>Figure V-21 : Production de biomasse correspondant aux bactéries totales (a) et à <i>M. parvicella</i> (b) - suivi <math>Al-Fe-Cl_3</math></i>	150
<i>Figure V-22 : Quantification de <i>M. parvicella</i> pour le suivi <math>Al-Fe-Cl_3</math></i>	151
<i>Figure V-23 : Indice de boues en fonction du nombre de copies de <i>M. parvicella</i> par <math>\mu g</math> d'ADN – Ensemble des mesures</i>	151

## Liste des tableaux

<i>Tableau I-1 : Performances épuratoires minimales des installations en fonction de la charge traitée et de la sensibilité du milieu récepteur .....</i>	<i>9</i>
<i>Tableau I-2 : Bactéries filamenteuses majoritairement identifiées lors de dysfonctionnements biologiques .....</i>	<i>25</i>
<i>Tableau I-3 : Synthèse des études ayant comparé l'efficacité de l'ajout d'aluminium et de fer pour le contrôle du foisonnement des boues .....</i>	<i>32</i>
<i>Tableau I-4 : Synthèse des études ayant rapporté des éléments de compréhension sur le contrôle de M. parvicella par l'ajout de sels d'aluminium.....</i>	<i>33</i>
<i>Tableau II-1 : Estimateur de la charge maximale reçue (EH) .....</i>	<i>41</i>
<i>Tableau II-2 : Charge maximale reçue – moyenne par strate à l'issue de l'échantillonnage .....</i>	<i>41</i>
<i>Tableau II-3 : Tests statistiques utilisés et conditions d'utilisation .....</i>	<i>46</i>
<i>Tableau II-4 : Caractéristiques de la solution commerciale utilisée lors des essais <math>AlCl_3</math> .....</i>	<i>48</i>
<i>Tableau II-5 : Doses de sels d'aluminium ajoutées lors du suivi <math>AlCl_3</math>.....</i>	<i>48</i>
<i>Tableau II-6 : Caractéristiques de la solution de sels de fer et d'aluminium utilisée lors du suivi <math>Al-Fe-Cl_3</math> .....</i>	<i>49</i>
<i>Tableau II-7 : Doses de sels métalliques ajoutées lors du suivi <math>Al-Fe-Cl_3</math>.....</i>	<i>49</i>
<i>Tableau II-8 : Méthodes d'analyse mises en œuvre par le laboratoire du SIAAP .....</i>	<i>50</i>
<i>Tableau II-9 : Analyses chimiques réalisées par le laboratoire DDP du SIAAP .....</i>	<i>51</i>
<i>Tableau II-10 : Fréquence des prélèvements pour les analyses biologiques et microbiologiques.....</i>	<i>52</i>
<i>Tableau II-11 : Techniques microbiologiques et observations microscopiques mises en œuvre .....</i>	<i>52</i>
<i>Tableau II-12 : Description des processus biologiques relatifs aux organismes hétérotrophes et autotrophes....</i>	<i>57</i>
<i>Tableau II-13 : Description des processus relatifs à la déphosphatation biologique et physico-chimique.....</i>	<i>58</i>
<i>Tableau II-14 : Indices Filamenteux (IF).....</i>	<i>60</i>
<i>Tableau II-15 : Protocole des colorations de Gram et de Neisser.....</i>	<i>60</i>
<i>Tableau II-16 : Sondes oligonucléotidiques – marquage FISH.....</i>	<i>61</i>
<i>Tableau II-17 : Description des amorces et des conditions de qPCR .....</i>	<i>64</i>
<i>Tableau II-18 : Description des amorces et des conditions de PCR .....</i>	<i>66</i>
<i>Tableau III-1 : Taux de réponse au questionnaire sur les dysfonctionnements biologiques des boues activées...</i>	<i>71</i>
<i>Tableau III-2 : Taux de charge hydraulique et organique des stations d'épuration .....</i>	<i>73</i>
<i>Tableau III-3 : Charge massique et âge de boues moyens .....</i>	<i>74</i>
<i>Tableau III-4 : Taux de charge hydraulique et organique selon les dysfonctionnements.....</i>	<i>80</i>
<i>Tableau III-5 : Types d'interventions réalisées suivant le type de dysfonctionnement observé (en nombre).....</i>	<i>82</i>
<i>Tableau III-6 : Liste des traitements curatifs mis en place .....</i>	<i>83</i>
<i>Tableau III-7 : Liste des paramètres de fonctionnement modifiés pour lutter contre les dysfonctionnements biologiques.....</i>	<i>84</i>
<i>Tableau IV-1. Bilans sur le paramètre phosphore total pour les différents suivis .....</i>	<i>92</i>
<i>Tableau IV-2. Bilans sur le paramètre aluminium pour les différents suivis .....</i>	<i>92</i>
<i>Tableau IV-3. Bilans sur le paramètre fer pour le suivi <math>Al-Fe-Cl_3</math>.....</i>	<i>92</i>

<i>Tableau IV-4 : Ratios caractéristiques des eaux résiduaires reçues par le pilote en entrée (ERU) et après décantation primaire (ED) pour les deux suivis – valeurs moyennes .....</i>	<i>99</i>
<i>Tableau IV-5 : Valeurs de l'équivalent-habitant sur la base de 60 g j<sup>-1</sup> de DBO<sub>5</sub> (Stricker et Héduit, 2010).....</i>	<i>101</i>
<i>Tableau IV-6 : Perturbations survenues lors du suivi AlCl<sub>3</sub> .....</i>	<i>104</i>
<i>Tableau IV-7 : Charges massiques et âges de boues pour les différentes périodes du suivi AlCl<sub>3</sub> .....</i>	<i>107</i>
<i>Tableau IV-8 : Charges massiques et âges de boues moyen pour les différentes périodes du suivi Al-Fe-Cl<sub>3</sub> .....</i>	<i>107</i>
<i>Tableau IV-9 : Paramètres de fractionnement de la DCO .....</i>	<i>108</i>
<i>Tableau IV-10 : Résultats de la simulation à l'état stationnaire .....</i>	<i>109</i>
<i>Tableau IV-11 : Variabilité des mesures liée à l'extraction de l'ADN .....</i>	<i>113</i>
<i>Tableau IV-12 : Synthèse des paramètres de quantification pour chaque espèce cible.....</i>	<i>114</i>
<i>Tableau IV-13 : Estimation du coefficient de variation moyen après consolidation des données pour chaque population d'intérêt .....</i>	<i>116</i>
<i>Tableau V-1 : Dose de sels métalliques appliquée rapportée à la quantité de phosphates reçus et à précipiter</i>	<i>127</i>
<i>Tableau V-2 : Caractérisation des agrégats biologiques, de la biodiversité et de l'abondance des bactéries filamenteuses en lien avec les conditions de décantation – Suivi AlCl<sub>3</sub>.....</i>	<i>130</i>
<i>Tableau V-3 : Caractérisation des agrégats biologiques, de la biodiversité et de l'abondance des bactéries filamenteuses en lien avec les conditions de décantation - Suivi Al-Fe-Cl<sub>3</sub> .....</i>	<i>131</i>
<i>Tableau V-4 : Indicateurs de diversité .....</i>	<i>139</i>

## Abréviations

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNr-16S	ADN codant pour la sous-unité 16S du ribosome
AGV	Acides Gras Volatils
AOB	Bactéries Ammonium Oxydantes
b	Taux de décès ( $j^{-1}$ )
BDERU	Base de Données sur les Eaux RésiduaireS UrbaineS
BET	Bromure d'éthidium
CBPO	Charge de pollution organique traitée (EH)
Cm	Charge massique ( $kg\ DBO_5\ (kg\ MVS)^{-1}\ j^{-1}$ )
CV	Coefficient de variation
Cq	Cycle seuil de quantification
Cy 3 et Cy 5	Cyanine 3 et 5
$DBO_5$	Demande Biochimique en Oxygène mesurée au bout de 5 jours ( $mg\ O_2\ L^{-1}$ )
DCOt	Demande Chimique en Oxygène totale ( $mg\ O_2\ L^{-1}$ )
DGGE	Électrophorèse sur gel en gradient dénaturant de l'anglais « <i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i> »
EH	Équivalent Habitant sur la base de 60 g de $DBO_5$ par équivalent-habitant
EPS	Substances Polymériques Extracellulaires
LB-EPS	EPS faiblement liées de l'anglais « loosely bound EPS »
TB-EPS	EPS fortement liées de l'anglais « tightly bound EPS »
ERU	Eau Résiduaire Urbaine
FA	Formamide
FISH	Hybridation <i>in situ</i> de sondes fluorescentes de l'anglais « <i>Fluorescent In Situ Hybridization</i> »
FITC	Fluorescéine Iso Thio Cyanate
IB	Indice de boues ( $mL\ g^{-1}$ )
IF	Indice filamenteux
IGN	Institut national de l'information géographique et forestière
INSEE	Institut national de la statistique et des études économiques
IM	Indice de Mohlman ( $mL\ g^{-1}$ )
LCFA	Acides gras à longue chaîne de l'anglais « <i>Long Chain Fatty Acids</i> »
Me	Atomes du type aluminium (Al) et/ou fer (Fe)
MEB	Microscopie Electronique à Balayage

MEB- EDX	Microscopie Électronique à Balayage associée à la microanalyse par Énergie Dispersive de rayons X (EDX)
MES	Matières En Suspension
MVS	Matières Volatiles en Suspension
$\mu_{\text{MAX}}$	Taux de croissance maximum ( $j^{-1}$ )
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NGL	Azote Global
N-NH <sub>4</sub> - S <sub>NH</sub>	Azote ammoniacal
NTC	No Template Control
NTK	Azote total Kjeldahl
Onema	Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques
OTU	Regroupement de séquences ADN en unité taxonomique de l'anglais « <i>Operational Taxonomic Unit</i> »
PAO	Organismes déphosphatants de l'anglais « <i>Polyphosphate Accumulating Organisms</i> »
PHA	Polyhydroxyalcanoates
PBS	Tampon phosphate salin de l'anglais « <i>Phosphate Buffered Saline</i> »
PCR	Réaction en chaîne par polymérase de l'anglais « Polymerase Chain Reaction »
$\phi X$	Flux en X ( $kg X j^{-1}$ )
P <sub>t</sub>	Phosphore total
P-PO <sub>4</sub> - SPO <sub>4</sub>	Orthophosphates
qPCR	PCR quantitative
SATESE	Service d'Assistance Technique aux Exploitants de Stations d'Épuration
S <sub>NOx</sub>	Nitrites et Nitrates
S <sub>NO2</sub>	Nitrites
S <sub>NO3</sub>	Nitrates
SIAAP	Service public de l'assainissement francilien
STEP	Station d'épuration
TAE	Tris acétate EDTA
TBE	Tris borate EDTA
TEMED	Tétraméthyléthylène diamine
XA	Biomasse autotrophe ( $g MVS m^3$ )
XH	Biomasse hétérotrophe ( $g MVS m^3$ )
XPAO	Biomasse déphosphatante ( $g MVS m^3$ )
Y	Rendement de conversion du substrat ( $g DCO_{\text{biomasse produite}} (g DCO_{\text{consommée}})^{-1}$ )

# Introduction générale

---

La directive-cadre sur l'eau (2000/60/CE) adoptée le 23 octobre 2000, vise à prévenir et à réduire la pollution des ressources en eau ainsi qu'à en promouvoir une utilisation durable afin de protéger l'environnement et d'améliorer l'état des écosystèmes aquatiques. Le traitement des eaux résiduaires urbaines doit par ailleurs satisfaire une réglementation de plus en plus stricte, qui est définie au niveau communautaire par la Directive européenne du 21 mai 1991 relative au traitement des eaux urbaines résiduaires (DERU) et au niveau national par l'arrêté du 22 juin 2007 relatif à la collecte, au transport et au traitement des eaux usées des agglomérations d'assainissement. Ces textes fixent notamment les niveaux de rejet minimum à atteindre pour les paramètres phosphore et azote dans le cas des agglomérations situées en zones sensibles à l'eutrophisation.

D'après le bilan d'assainissement de l'Onema réalisé en 2008, la majorité des installations mises en œuvre pour le traitement des eaux résiduaires urbaines fonctionne selon le principe des boues activées en aération prolongée (Golla *et al.* 2010). En effet, il s'agit d'une filière adaptée au traitement des paramètres visés par la réglementation et dont le fonctionnement est globalement bien maîtrisé.

Ce type de stations d'épuration est cependant sujet à des dysfonctionnements biologiques induits, dans certaines conditions de fonctionnement ou en fonction des caractéristiques de l'influent, par la prolifération excessive de bactéries filamenteuses. Ces bactéries peuvent conduire à une altération des conditions de décantation et à des phénomènes de moussage, et entraîner des pertes de matières en suspension vers le milieu récepteur et donc un non-respect des niveaux de rejet. *Microthrix parvicella* (*M. parvicella*) a été depuis longtemps la bactérie filamenteuse la plus fréquemment identifiée lors de ces dysfonctionnements (Pujol and Canler 1989; Pujol *et al.* 1991; Graveleau *et al.* 2005) et continue à être mise en cause (Mielczarek *et al.* 2012; Mallouhi and Austermann-Haun 2014).

Afin de pallier ces dysfonctionnements, différentes mesures préventives ont été préconisées comme l'installation de zones de contact en amont des bassins biologiques (Pujol and Canler 1994; Canler 2005) ou l'application de paramètres opératoires adaptés (Xie *et al.* 2007). Cependant, leur efficacité n'est pas toujours garantie (Jenkins *et al.* 2004; Noutsopoulos *et al.* 2010) et la recherche de solutions curatives reste pertinente.

Le traitement curatif le plus souvent utilisé est la chloration. Cependant, à un dosage mal adapté, son action non spécifique impacte également les bactéries responsables du traitement du carbone et de l'azote (Wakefield and Slim 1988; Wagner *et al.* 1994; Wanner 1994; Jenkins *et al.* 2004). De plus, les coproduits de dégradation du chlore sont toxiques pour l'environnement, et ont conduit certains pays à considérer l'utilisation de la chloration uniquement comme mesure d'urgence (ATV 1989). Dans l'objectif de proposer une solution alternative, différentes études ont montré que l'aluminium aurait une action spécifique sur *M. parvicella* (Paris *et al.* 2005). Les mécanismes d'action restent cependant mal connus.

L'objectif du travail réalisé dans le cadre de cette thèse était de caractériser l'impact d'un ajout de sels métalliques sur les boues activées, analysé sous le double angle du procédé et de la biologie. Il s'agissait *in fine* de préconiser les dosages et les modes de traitement adaptés à la lutte contre le foisonnement et le moussage biologiques dus à la prolifération de *M. parvicella*.

Un état des lieux a dans un premier temps été réalisé afin d'actualiser les données sur l'occurrence des dysfonctionnements biologiques à l'échelle nationale, et de recenser les traitements curatifs mis en place par les exploitants de stations d'épuration.

La démarche expérimentale a ensuite consisté à analyser le fonctionnement d'un pilote semi-industriel soumis à des dysfonctionnements biologiques traités par ajouts de sels métalliques. Différents outils du génie des procédés (étude des performances épuratoires de l'installation, modélisation du fonctionnement du pilote), de la microbiologie et de la biologie moléculaire (microscopie, qPCR, DGGE, inventaire moléculaire) ont été mis en œuvre pour réaliser ce suivi. L'une des forces de ce travail réside dans la confrontation de données issues de ces outils de nature très différente. Dans la littérature, l'impact des sels d'aluminium sur *M. parvicella* a en effet été étudié sur sites réels ou pilotes de boues activées en observant l'apparition et la disparition des mousses et en suivant l'indice de boues (Roels *et al.* 2002), ou à l'aide de méthodes microbiologiques complexes mais à l'échelle du laboratoire (Nielsen *et al.* 2005; Hamit-Eminovski *et al.* 2010; Knaf *et al.* 2013).

Le manuscrit de thèse est organisé en cinq chapitres.

Dans le premier chapitre, une synthèse bibliographique présente brièvement le principe des boues activées et décrit le métabolisme de *M. parvicella*. Les mécanismes proposés pour expliquer l'action de l'aluminium dans le contrôle du foisonnement induit par *M. parvicella* sont également détaillés.

Le deuxième chapitre décrit les différentes méthodes mises en œuvre au cours du travail présenté.

Les résultats de l'enquête réalisée pour préciser l'occurrence des dysfonctionnements biologiques en lien avec le fonctionnement des installations et pour recenser les solutions curatives mises en place par les exploitants font l'objet du chapitre trois.

Le chapitre quatre est consacré à la consolidation des données requises d'une part pour l'analyse du fonctionnement du pilote et, d'autre part, pour l'exploitation du suivi quantitatif des biomasses par qPCR.

L'étude de l'impact de l'ajout des sels métalliques sur le fonctionnement du pilote et la biologie des boues activées est analysée dans le cinquième chapitre du manuscrit.

Les conclusions générales et les perspectives de recherche sont exposées dans un dernier chapitre.





# **Chapitre I. Synthèse bibliographique**

---

## I.1. Procédé de traitement des eaux usées par voie biologique

### I.1.1. Les stations d'épuration en France

D'après la Base de Données des Eaux Résiduaires Urbaines (BDERU) du ministère de l'écologie, du développement durable et de l'énergie, la France métropolitaine comptait environ 19 500 stations en 2012 (BDERU 2012). Elles ont été dimensionnées pour traiter une charge de 98 millions d'équivalents habitants (EH, 1 EH = 60 g DBO<sub>5</sub>) et ont traité une charge maximale de 76 millions d'EH pour une population métropolitaine estimée par l'INSEE à 63,7 millions d'habitants en 2012.

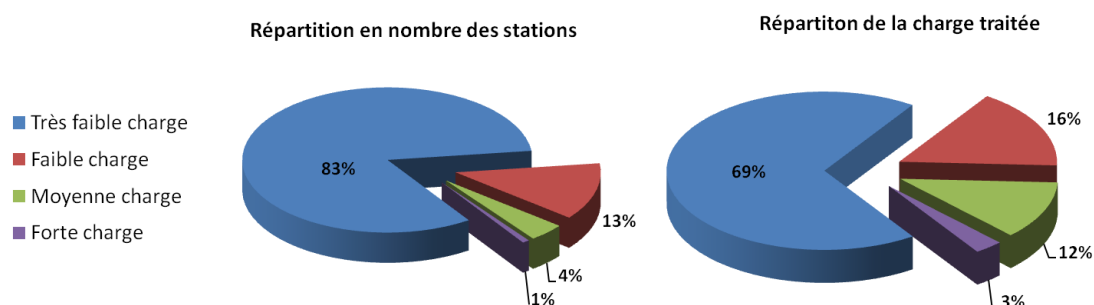
Les stations d'épuration du type boues activées représentent en nombre 36 % des stations et traitent 73 % de la charge polluante de la France métropolitaine. Le bilan assainissement de l'Onema (Golla *et al.* 2010) a mis en évidence que 91% des stations ayant une capacité de traitement supérieure à 2 000 EH sont du type boues activées. Cette filière de traitement est en effet bien maîtrisée et adaptée pour le traitement des paramètres visés par la directive ERU (matière organique, azote et phosphore).

#### I.1.1.1. Les stations d'épuration à boues activées

Les stations d'épuration à boues activées se déclinent suivant trois domaines caractérisés par leur charge massique (Cm) (Équation II-8) :

- Forte charge :  $C_m > 0,5 \text{ kg DBO}_5 (\text{kg MVS})^{-1} \text{ j}^{-1}$  ;
- Moyenne charge :  $0,2 < C_m < 0,5 \text{ kg DBO}_5 (\text{kg MVS})^{-1} \text{ j}^{-1}$  ;
- Faible charge :  $0,1 < C_m < 0,2 \text{ kg DBO}_5 (\text{kg MVS})^{-1} \text{ j}^{-1}$  ;
- Très faible charge :  $C_m < 0,1 \text{ kg DBO}_5 (\text{kg MVS})^{-1} \text{ j}^{-1}$ .

La répartition du taux de stations et de la charge brute de pollution organique (CBPO) selon ces domaines de charge est décrite sur la Figure I-1.



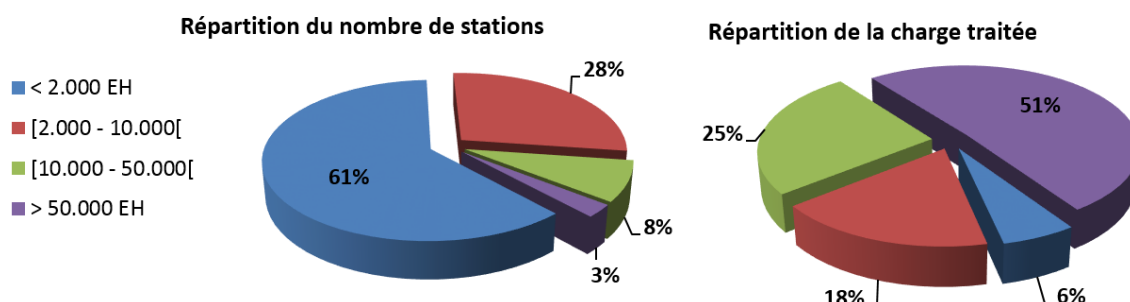
**Figure I-1 : Répartition des stations à boues activées selon leur domaine de charge**  
*Gauche : répartition en nombre – Droite : répartition selon la charge journalière de DBO<sub>5</sub> admise par la station au cours de la semaine la plus chargée de l'année (CBPO)*

Les stations du type boues activées très faibles charge et/ou aération prolongée représentent en nombre la plus grande partie des stations à boues activées et traitent également la plus grande part de la pollution. Ce procédé a l'avantage de permettre un traitement poussé de l'azote en appliquant des âges de boues longs (> 15 jours à 12°C) qui sont favorables au

développement de la biomasse correspondante. Comme il a été indiqué en introduction et comme il le sera plus amplement détaillé en paragraphe I.3 page 22, ce type de procédé est sujet au développement excessif de bactéries filamenteuses. Une attention particulière sera par conséquent portée à celui-ci.

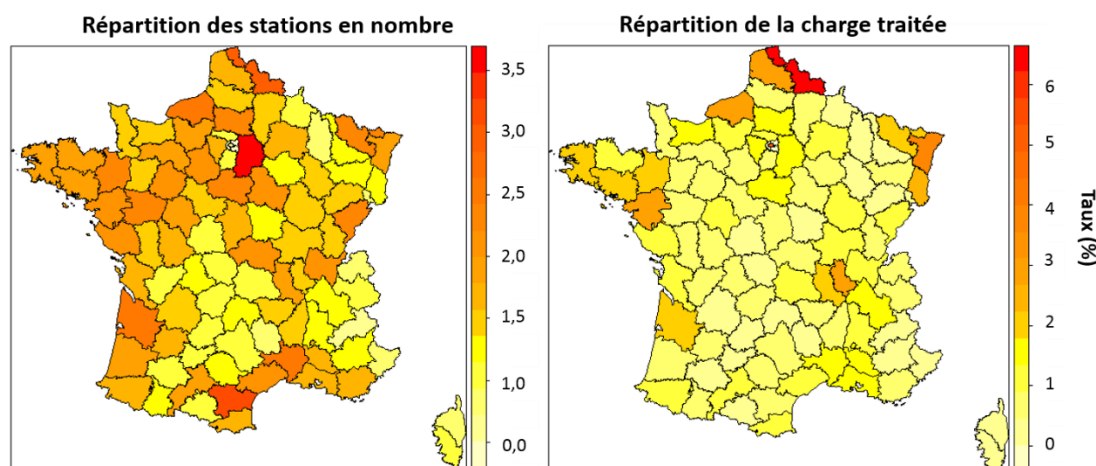
#### ***1.1.1.1. Les stations d'épuration à boues activées faible charge***

La métropole française comptait en 2012 environ 6 500 stations d'épuration à faible charge et/ou aération prolongée. Leur répartition en nombre et en charge de pollution traitée selon les quatre catégories de la Méthode de référence de la directive européenne n° 91/271/CEE du 21 mai 1991, est représentée sur la Figure I-2.



**Figure I-2 : Répartition des stations à boues activées faible charge et aération prolongée selon la charge maximale traitée**  
Gauche : répartition en nombre – Droite : répartition selon la charge de pollution organique traitée (CBOP)

Les stations à boues activées faible charge ayant une capacité de traitement inférieure à 10 000 EH représentent près de 90 % de ce type de stations mais ne traitent que 25 % de la pollution. Globalement, 10 % de stations traitent 76 % des eaux résiduaires urbaines. La répartition des stations en nombre et en charge de pollution traitée sur les départements de France métropolitaine est représentée sur la Figure I-3.



**Figure I-3 : Répartition des stations à boues activées faible charge selon les départements métropolitains français**  
Gauche : répartition en nombre – Droite : répartition de la charge de pollution organique traitée (CBPO en EH)  
(Réalisé avec le logiciel R – le fond de carte est issu des bases de données IGN)

Le nombre de stations est globalement d'autant plus élevé que la densité de population est importante, exceptée en Ile-de-France. En effet, le département du 75 compte 5 stations d'épuration et seulement une station fonctionnant à boues activées faible charge/aération prolongée. Les autres sont des stations du type biofiltres, bioréacteurs à membranes ou des stations à boues activées fonctionnant en moyenne charge.

Une disparité entre les régions en termes de nombre de stations et de charge traitée peut être observée. Cette disparité est naturellement due aux différences d'urbanisation et de densité de population.

### 1.1.2. Principe des stations d'épuration à boues activées très faible charge

#### 1.1.2.1. Description du procédé

Les eaux usées urbaines sont collectées et acheminées via le réseau d'assainissement vers la station d'épuration. Les eaux de pluie peuvent être collectées par le même réseau, ou à l'aide d'un réseau spécifique (un réseau séparatif). Le schéma de fonctionnement type d'une station d'épuration à boues activées est décrit en Figure I-4.

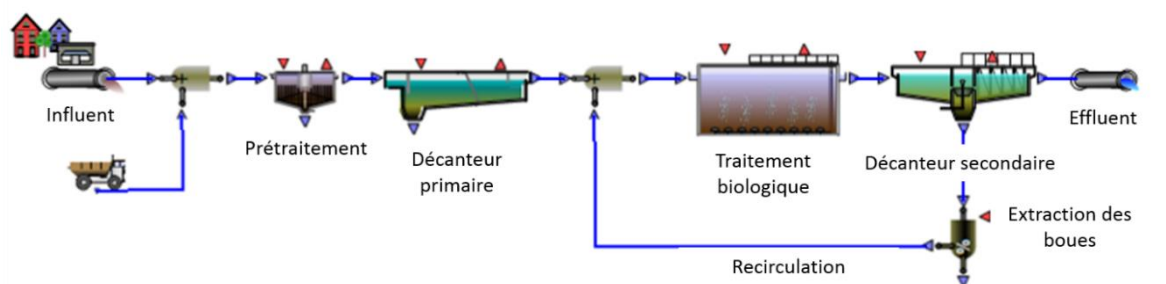


Figure I-4 : Principe de fonctionnement d'une station d'épuration à boues activées

Après l'arrivée au poste de relèvement, l'eau usée passe par une étape de prétraitement qui comprend un dégrillage, un dégraissage et un dessablage. L'eau prétraitée peut être acheminée vers un décanteur primaire (selon la taille de l'installation). Elle est ensuite mise en contact avec les micro-organismes qui consomment la pollution organique, la pollution azotée et phosphorée pour leur croissance. Cette étape, appelée traitement biologique, consiste à éliminer le carbone et à nitrifier l'azote en phases aérées, puis à dénitrifier les nitrates lors de phases anoxiques (absence d'oxygène mais présence de nitrates). Une phase anaérobie (absence d'oxygène et de nitrates) peut être mise en place et ainsi permettre la déphosphatation biologique. Ce procédé peut être complété par un traitement physico-chimique. La clarification permet la séparation de l'eau traitée et de la boue formée dans le bassin biologique. C'est généralement l'ultime étape avant le rejet en milieu naturel, un traitement tertiaire peut éventuellement être mis en place pour affiner les rendements d'abattement. Les boues formées lors du traitement sont recirculées vers le bassin biologique afin de maintenir une concentration constante en micro-organismes. Les boues en excès sont extraites du système, généralement après épaissement dans le clarificateur.

### 1.1.2.2. Performances épuratoires minimales

Les stations d'épuration ont pour obligation d'atteindre des performances épuratoires minimales dont le niveau varie selon leur charge et la sensibilité du milieu récepteur. Elles ont été définies dans l'arrêté du 22 juin 2007 et sont synthétisées dans le Tableau I-1.

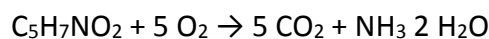
**Tableau I-1 : Performances épuratoires minimales des installations en fonction de la charge traitée et de la sensibilité du milieu récepteur**

Paramètres	Concentration (mg L <sup>-1</sup> ) à ne pas dépasser	Rendement (%) minimum à atteindre
Installations traitant une charge brute inférieure ou égale à 120 Kg DBO <sub>5</sub> j <sup>-1</sup>		
DBO <sub>5</sub>	35	60
DCO		60
MES		50
Installations traitant une charge brute supérieure ou égale à 120 Kg DBO <sub>5</sub> j <sup>-1</sup>		
DBO <sub>5</sub>	120 Kg DBO <sub>5</sub> j <sup>-1</sup> < Charge reçue ≤ 600 Kg DBO <sub>5</sub> j <sup>-1</sup>	70
	600 Kg DBO <sub>5</sub> j <sup>-1</sup> < Charge reçue	80
DCO	125	75
MES	35	35
Rejet en zone sensible à l'eutrophisation		
Azote (NGL)	600 Kg DBO <sub>5</sub> j <sup>-1</sup> < Charge reçue ≤ 6 000 Kg DBO <sub>5</sub> j <sup>-1</sup>	70
	6 000 Kg DBO <sub>5</sub> j <sup>-1</sup> < Charge reçue	
Phosphore (P <sub>t</sub> )	600 Kg DBO <sub>5</sub> j <sup>-1</sup> < Charge reçue ≤ 6 000 Kg DBO <sub>5</sub> j <sup>-1</sup>	80
	6 000 Kg DBO <sub>5</sub> j <sup>-1</sup> < Charge reçue	

### 1.1.3. Les biomasses épuratrices

Les boues activées sont constituées de biomasse, de matière organique et inorganique sous forme particulaire et soluble, maintenues en suspension dans les bassins biologiques. Les conditions d'exploitation ont pour objectif de favoriser la croissance des micro-organismes sous forme floculée formant ainsi des agrégats biologiques et permettant leur décantation dans le clarificateur.

La composition moléculaire de la biomasse peut être exprimée suivant la formule chimique générale C<sub>5</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub> et sa quantité dans le système peut être estimée par les matières volatiles en suspension (MVS) (Ali *et al.* 1985) ou par la demande chimique en oxygène (DCO) (Henze *et al.* 1987). Selon l'équation de l'oxydation de la biomasse décrite par l'Équation I-1, 1 gramme de MVS équivaut à 1,42 gramme de DCO.



*Équation I-1*

L'écosystème des boues activées est très complexe. Des archées, des protozoaires et métazoaires (eucaryotes microscopiques) cohabitent avec différentes souches bactériennes qui se distinguent en deux grands types de biomasse :

- **La biomasse hétérotrophe** : principale composante responsable de la dégradation de la pollution organique en conditions aérobies ou anoxiques ;
- **La biomasse autotrophe** : responsable entre autres des réactions d'oxydation de l'ammonium en conditions aérobies.

#### *1.1.3.1. La microfaune*

Les protozoaires et métazoaires sont des organismes prédateurs des bactéries libres. Ils participent à la clarification du liquide interstitiel ainsi qu'à la cohésion des floccs.

#### *1.1.3.2. Les bactéries responsables de la dégradation des matières carbonées*

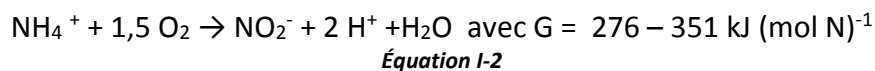
Le carbone organique est généralement la principale source de pollution à éliminer. Le carbone est également le constituant de base de tout organisme vivant. De nombreux organismes sont amenés à consommer du carbone et donc à participer à sa dégradation. Ce sont majoritairement les bactéries hétérotrophes qui vont dégrader le carbone organique, en conditions aérobies, anaérobies ou anoxiques.

#### *1.1.3.3. Les bactéries responsables de la dégradation de l'azote*

La dégradation de l'azote se déroule en deux étapes, la nitrification (oxydation de l'azote ammoniacal en nitrite puis en nitrates) et la dénitrification (réduction des nitrites et nitrates en diazote).

##### *1.1.3.3.1. La nitrification*

La nitrification est réalisée en conditions aérobies et le processus peut être représenté de manière simplifiée en deux étapes : la nitrosation et la nitratation. La première étape est réalisée par des bactéries nitrosantes (AOB de l'anglais Ammonia Oxidizing Bacteria) et la seconde par les bactéries nitratantes (NOB de l'anglais Nitrite Oxidizing Bacteria). La réaction de nitrosation est décrite par l'Équation I-1 et la réaction de nitratation par l'Équation I-3.



Les bactéries nitrosantes (AOB) sont des *Betaprotéobacteria* de l'ordre des *Nitrosomonadales* (*Nitrosomonas*, *Nitrospira*, *Nitrosolobus* et *Nitrosovibrio*) (Koops *et al.* 2003). La Figure I-5 représente l'arbre phylogénétique des grands groupes des AOB.

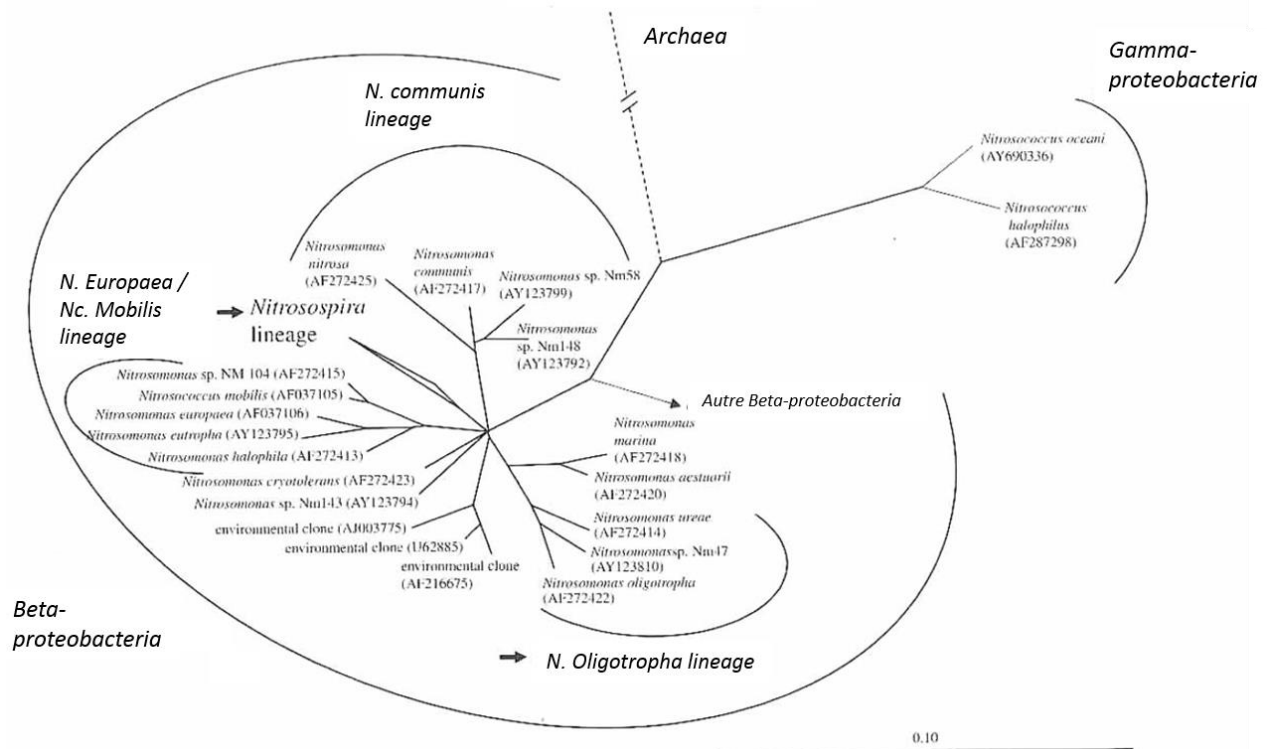


Figure I-5 : Arbre phylogénétique des bactéries nitrosantes (AOB) basé sur les séquences d'ADNr 16S (Seviour and Nielsen 2010)

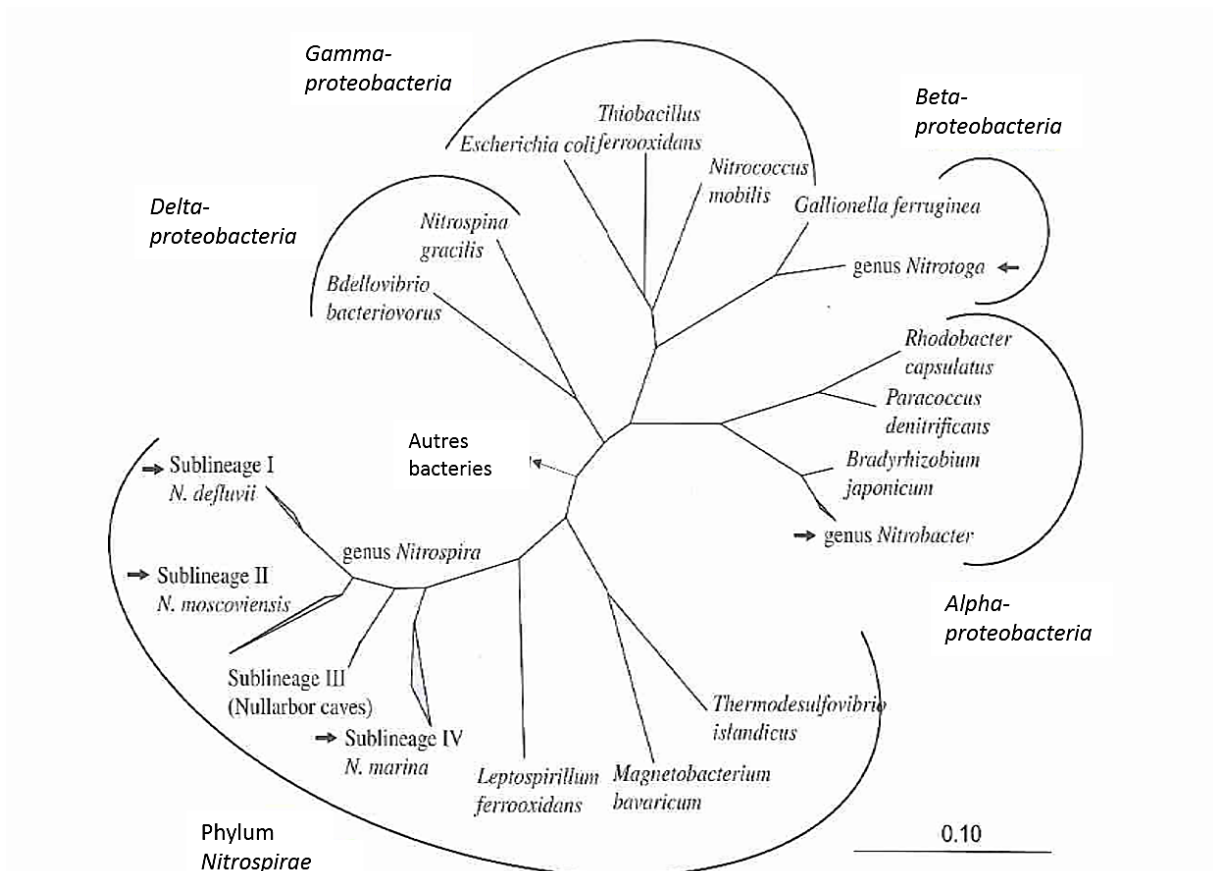


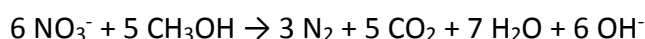
Figure I-6 : Arbre phylogénétique des bactéries nitrifiantes (NOB) basé sur les séquences d'ADNr 16S (Seviour and Nielsen 2010)



Les bactéries nitrifiantes (NOB) appartiennent à quatre genres : *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospina* et enfin *Nitrospira* qui serait le plus fréquent dans les boues activées (Gieseke *et al.* 2003). La Figure I-6 représente l'arbre phylogénétique de ces groupes et les classes auxquelles ils appartiennent.

#### ***1.1.3.3.1. La dénitrification***

La dénitrification correspond au processus de dégradation de la pollution organique en conditions anoxiques en utilisant les nitrites et les nitrates comme accepteurs d'électrons. Ce processus se déroule en plusieurs phases et fait intervenir différentes enzymes catalytiques. La réaction simplifiée de la dénitrification peut s'écrire selon l'Équation I-4 en utilisant comme source de carbone le méthanol.



***Équation I-4***

La réduction des nitrates en diazote gazeux est réalisée par des bactéries hétérotrophes. Leur distribution phylogénique est très hétérogène et serait variable selon la nature des substrats disponibles et du procédé mis en œuvre sur la station (Seviour and Nielsen 2010). Les principales bactéries dénitrifiantes appartiennent essentiellement à la classe des *Betaproteobactérie* et quelques autres se trouvent parmi les classes de *Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria* et le phylum des *Actinobacteria* (Morgan-Sagastume *et al.* 2008).

#### ***1.1.3.4. Les bactéries responsables de la dégradation du phosphore***

En conditions anaérobies, les PAO (Polyphosphate Accumulating Organisms) ont la capacité de stocker des PHA (polyhydroxyalcanoate) synthétisés à partir de substrats facilement biodégradables des eaux usées comme les acides gras volatils (AGV) et de l'énergie libérée par l'hydrolyse des réserves intracellulaires de polyphosphates. Le pouvoir réducteur est fourni par des réserves de glycogène. Dans ces conditions, les PAO peuvent être en compétition vis-à-vis du substrat avec les GAO (Glycogen Accumulating non-polyP Organisms) appartenant essentiellement à la classe des *Gammaproteobacteria*.

En conditions aérobies ou anoxiques, l'oxydation des réserves de PHA des PAO et de la matière organique libère suffisamment d'énergie pour permettre le renouvellement des réserves et la croissance des bactéries déphosphatantes. L'élimination biologique du phosphore résulte d'une réabsorption plus importante des phosphates que la quantité relarguée en conditions anaérobies. Les réactions biochimiques des PAO sont schématisées sur la Figure I-7.

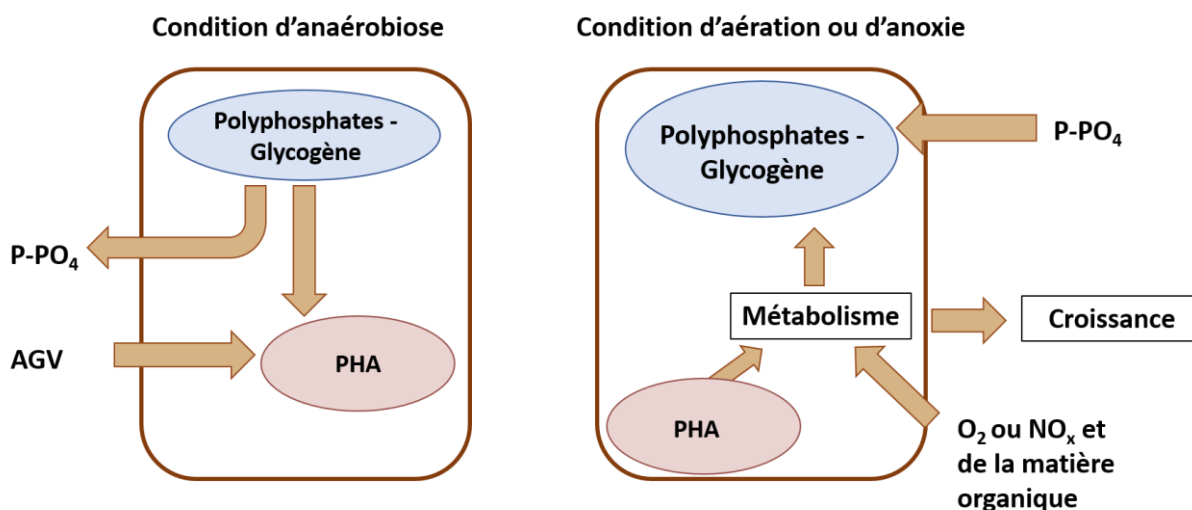


Figure I-7 : Réactions biochimiques simplifiées pour une bactérie déphosphatante  
Avec AGV : acides gras volatils - PHA : polyhydroxyalcanoate - P-PO<sub>4</sub> : orthophosphate - NO<sub>x</sub> : Nitrite et/ou nitrate

La phylogénie des PAO est très hétérogène. La majorité des PAO a été identifiée comme correspondant à *Candidatus Accumulibacter phosphatis* de l'ordre des *Rhodocyclales* de la classe des *Betaproteobacteria*. Du même ordre, les *Dechloromonas* participeraient également à la déphosphatation biologique et auraient un rôle non négligeable dans le procédé de dénitrification (Kong *et al.* 2007; Lv *et al.* 2014). D'autres bactéries, notamment du phylum des *Actinobacteria*, ont également la capacité de suraccumuler le phosphore. Ces bactéries ont un fonctionnement différent des PAO conventionnelles. Les AGV ne sont pas utilisés comme substrat en conditions anaérobies et les réserves intracellulaires correspondent à d'autres molécules que les PHA. Deux morphotypes de PAO *Actinobacteria* ont été identifiées comme correspondant au genre *Tetrasphaera* et *Intrasporangiaceae* (Kong *et al.* 2005).

Selon les études et le type de procédé, *Accumulibacter* représenterait 6 à 20 % de la biomasse totale soit 26 à 73 % des PAO totaux (Zilles *et al.* 2002; Zilles *et al.* 2002; Seviour and Nielsen 2010). Les PAO *Actinobacteria* représenteraient 3 à 16 % de la biomasse totale (Kong *et al.* 2005) et les PAO *Dechloromonas* 5 à 20 % de la biomasse totale (Lv *et al.* 2014). L'écologie des PAO n'est pas encore bien connue et serait très variable d'une installation à l'autre.

#### 1.1.3.5. Les bactéries filamenteuses

Les bactéries filamenteuses jouent un rôle important dans la formation des structures floculées des boues en les rendant plus résistantes à la prédation et aux perturbations hydrodynamiques (Parker *et al.* 1971). Cependant, lorsque leur densité est trop importante, la densité apparente des agrégats peut être diminuée, entraînant des dysfonctionnements biologiques plus amplement détaillés au paragraphe 1.3.1.

Il existe une grande variété de bactéries filamenteuses. Toutes ne sont pas identifiées et pour certaines il existe peu de données sur leur implication dans les dysfonctionnements biologiques. Trente morphologies différentes ont été observées dans les stations d'épuration municipales (Eikelboom 2000), quarante autres dans les stations industrielles (Eikelboom and Geurkink 2002). Seulement dix de ces morphotypes sont à l'origine de 90 % des problèmes de foisonnement (Jenkins *et al.* 2004).

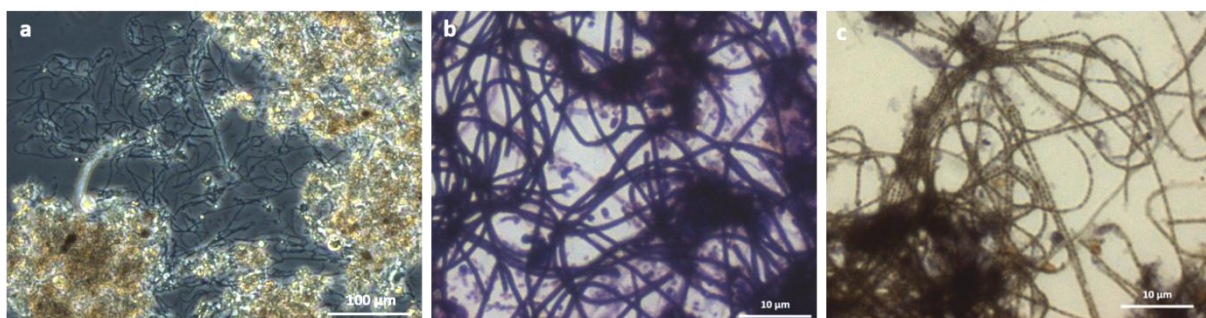
Les bactéries filamenteuses constituent en moyenne 24 % des bactéries d'après une étude récente réalisée sur 24 installations à boues activées très faibles charges danoises. 35 % d'entre elles rencontraient des problèmes de décantation dont 15 % associés à une forte présence de bactéries filamenteuses (Mielczarek *et al.* 2012). D'après cette même étude, les bactéries filamenteuses les plus abondantes sont *Microthrix* du *phylum Actinobacteria*, *phylum Chloroflexi* et *phylum TM7*. *Microthrix* représenterait entre 11 à 20 % des bactéries filamenteuses, le *phylum Chloroflexi* entre 30 à 60 % et en moyenne 10 % pour le *phylum TM7*.

### ***1.1.3.6. Exemple de *Microthrix parvicella****

#### ***1.1.3.6.1. Morphologie***

Lorsque les conditions sont favorables à sa prolifération, *M. parvicella* se développe sous la forme d'un long filament (100 à 500  $\mu\text{m}$ ), fin (diamètre de 0,6 à 0,8  $\mu\text{m}$ ) et sinueux. Le filament n'est ni gainé, ni ramifié (Jenkins *et al.* 2004). *M. parvicella* est Gram positif (Figure I-8.c), Neisser négatif mais granules-positif (Figure I-8.b) (Wanner 1994; Jenkins *et al.* 2004).

Il peut se situer dans le liquide interstitiel, dans le pourtour des agrégats ou encore à l'intérieur de ces derniers (Figure I-8.a). De par sa morphologie, il peut créer des phénomènes d'ouverture des floccs et de pontage inter-floccs et ainsi altérer la capacité des agrégats à décanter.



**Figure I-8 : Morphologie de *M. parvicella***  
**Observée en état frais (a), en coloration de Gram (b) et en coloration de Neisser (c)**

#### ***1.1.3.6.2. Métabolisme***

*M. parvicella* est une bactérie filamenteuse micro-aérophile chimio-organotrophe (Wanner 1994; Rossetti *et al.* 2005). Cette bactérie est non fermentative mais peut utiliser différents accepteurs d'électrons suivant les conditions d'aération (Andreasen and Nielsen 2000). *M. parvicella* est considéré comme un organisme accumulant les lipides (lipid-accumulating organism : LAO) ; son métabolisme est schématisé sur la Figure I-9.

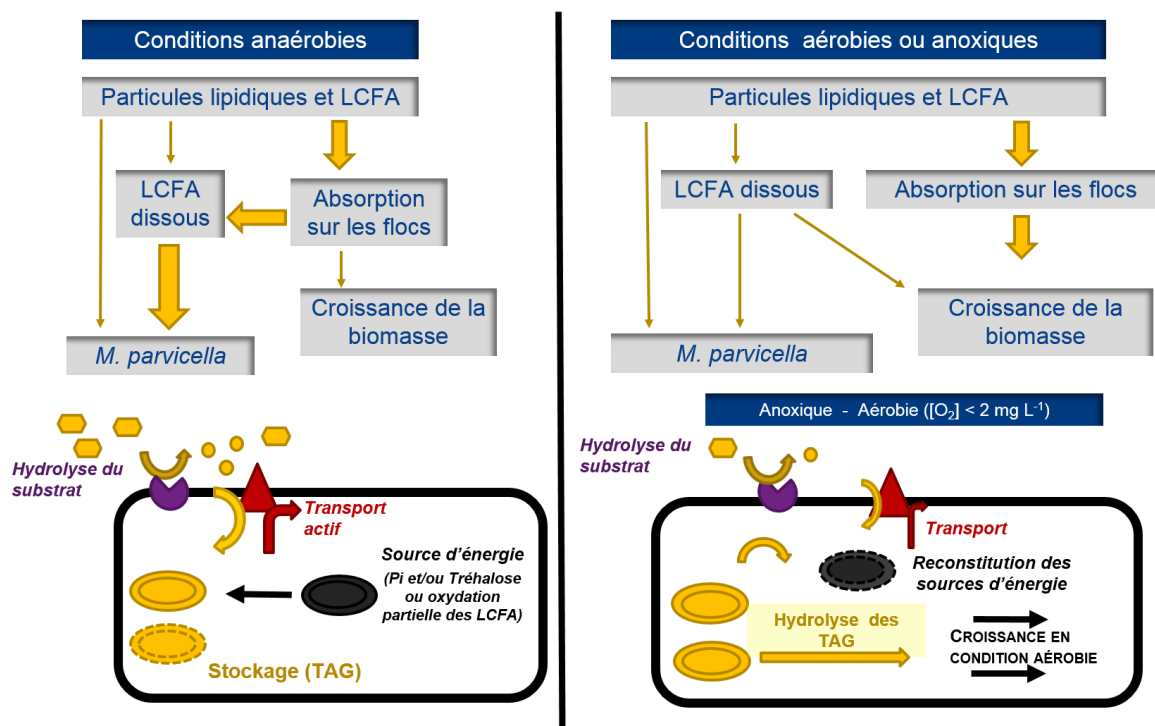


Figure I-9 : Schéma du métabolisme de *M. parvicella*  
Modifié de Nielsen et al. (2002) à partir des données de McIlroy et al. (2013)

D'après des études *in situ*, les substrats utilisés préférentiellement par *M. parvicella* sont les acides gras à longues chaînes (long chain fatty acids : LCFA) (Slijkhuys et al. 1984; Andreassen and Nielsen 1998; Nielsen and Nielsen 2002). La surface du filament de *M. parvicella* étant hydrophobe, les LCFA et d'autres molécules non polaires s'y fixeraient préférentiellement (Nielsen et al. 2002). Le substrat est ensuite hydrolysé par des enzymes de surface, du type lipases et estérases, avant d'être assimilé par transport actif (Nielsen et al. 2002; McIlroy et al. 2013). En conditions anaérobies, *M. parvicella* accumule des lipides sous forme de triacylglycérides (TAG) avant de les réutiliser en conditions aérobies pour sa croissance (Andreassen and Nielsen 2000).

Un certain nombre de questions persiste sur la source d'énergie nécessaire à ce stockage et sur le métabolisme impliqué. L'étude du génome de *M. parvicella* a montré qu'il pourrait s'agir de réserves de polyphosphate et/ou de tréhalose ou éventuellement une hydrolyse partielle des LCFA (McIlroy et al. 2013).

Le métabolisme flexible de *M. parvicella* lui permet de s'adapter aux différentes conditions opératoires des systèmes à boues activées qui alternent les conditions anaérobies relativement riches en carbone et les conditions aérobies plus pauvres.

#### I.1.3.6.3. Paramètres impactant le développement de *M. parvicella*

- Les conditions d'aération

La concentration en oxygène peut affecter considérablement le développement de *M. parvicella*. Comme indiqué précédemment, *M. parvicella* est une bactérie micro-aérophile. Une teneur en oxygène supérieure à  $2 \text{ mg L}^{-1}$  serait défavorable à son développement (Rossetti et al. 2005).

- La température

De façon générale, les dysfonctionnements biologiques engendrés par *M. parvicella* surviennent durant les saisons froides, pour des températures comprises entre 7 et 15°C (Eikelboom *et al.* 1998; Miana *et al.* 2002).

Selon Knoop *et al.* (1998), qui ont suivi la croissance de *M. parvicella* en boues activées, son taux de croissance optimum serait atteint entre 12 et 15°C. Il n'y aurait plus de croissance sous forme filamenteuse pour des températures supérieures à 20°C, le filament deviendrait court (30-80 µm) et les conditions de décantation s'amélioreraient (indice de boues inférieur à 150 mL g<sup>-1</sup>).

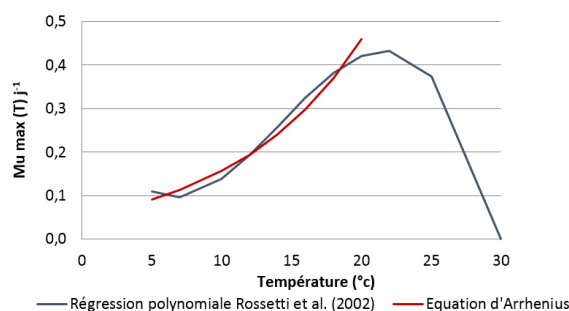
Les études en laboratoire ont montré que la vitesse maximale de croissance de *M. parvicella* est atteinte pour des températures autour de 22°C et que le taux de croissance à 20°C ( $\mu_{\max}$  (20°C)) serait compris entre 0,37 et 0,66 j<sup>-1</sup> (Rossetti *et al.* 2002). Entre 7 et 20°C, le taux de croissance peut être estimé à partir d'une équation d'Arrhenius. L'évolution de  $\mu_{\max}$  en fonction de la température selon l'étude menée par Rossetti *et al.* (2002) est représentée sur la Figure I-10.

Régression polynomiale définie par Rossetti *et al.* (2002) à partir des mesures réalisées sur un milieu de culture du type 4B :

$$\mu_{\max}(T) = 0,361 - 0,088 T + 8,56 \cdot 10^{-3} T^2 - 2,02 \cdot 10^{-4} T^3$$

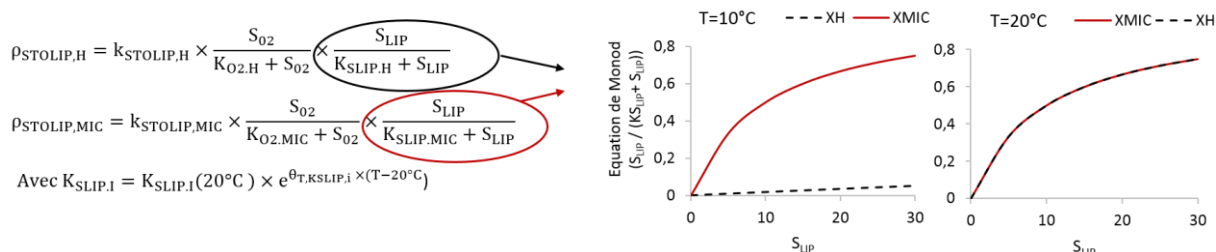
Equation d'Arrhenius écrite à partir des paramètres définis par Rossetti *et al.* (2002) sur un milieu de culture 4B :

$$\mu_{\max}(T) = \mu_{\max}(20^\circ\text{C}) \times \theta^{(T-20)} \text{ Avec } \mu_{\max} = 0,46 \text{ j}^{-1} \text{ et } \theta = 1,114$$



**Figure I-10 : Évolution du taux de croissance maximal de *M. parvicella* ( $\mu_{\max}$ ) en fonction de la température selon l'étude de Rossetti *et al.* (2002)**

Afin de modéliser le comportement saisonnier de *M. parvicella*, Hug *et al.* (2006) ont diminué l'affinité pour les substrats lipidiques des bactéries hétérotrophes au profit de *M. parvicella*, la solubilité des lipides étant considérée également plus faible à basse température. La variation de l'affinité du substrat pour les bactéries hétérotrophes et *M. parvicella* est décrite à 10°C et à 20°C sur la Figure I-11 ainsi que les équations correspondant au processus de stockage des lipides ( $\rho_{\text{STOLIP},i}$ ).



**Figure I-11 : Représentation de la variation saisonnière de l'affinité pour les lipides de *M. parvicella* et des bactéries hétérotrophes selon le modèle de Hug *et al.* (2006) - Avec  $K_{\text{SLIP},i}$  la constante d'affinité calée à 10 g DCO m<sup>-3</sup>,  $\theta_{T,K_{\text{SLIP},i}}$  le facteur de réduction de la constante d'affinité estimée à 0,4 pour les bactéries hétérotrophes et 0 pour *M. parvicella*.**

Ces hypothèses ont permis aux auteurs de représenter la compétition entre *M. parvicella* et les bactéries hétérotrophes, qui est à l'avantage de *M. parvicella* à basse température, et explique donc les évolutions saisonnières observées.

- La charge reçue par l'installation

Afin de favoriser la croissance des bactéries autotrophes pour le traitement de l'azote, les stations à boues activées fonctionnent à très faible charge massique ( $C_m < 0,1 \text{ kg DBO}_5 (\text{kg MVS})^{-1} \text{ j}^{-1}$ ) avec des âges de boues supérieurs à 10 jours (Deronzier *et al.* 2002). Ces conditions sont également favorables à la croissance de *M. parvicella* dont le taux de croissance ( $\mu_{\max}$ ) est presque deux fois plus faible que celui des AOB à 20°C ( $\mu_{\max, \text{AOB}} \approx 0,7 \text{ j}^{-1}$ ) (Rossetti *et al.* 2005; Munz *et al.* 2011).

- Les substrats

Les substrats préférentiels de *M. parvicella* sont les lipides à longue chaîne carbonée (LCFA) mais il pourrait également utiliser des substrats carbonés plus simples comme le glucose ou l'acétate (Wanner 1994; Tandoi *et al.* 1998; Andreasen and Nielsen 2000). Le taux de conversion du substrat en biomasse est faible, de l'ordre de 0,10 à 0,17 mg MVS (g DCO)<sup>-1</sup>. Par contre, ce micro-organisme aurait une forte affinité pour le substrat (Rossetti *et al.* 2002; Rossetti *et al.* 2005). En effet, la constante de saturation a été estimée à 3,9 mg DCO L<sup>-1</sup> d'après des analyses en laboratoire (Rossetti *et al.* 2002) et à 10 mg DCO L<sup>-1</sup> d'après le calage du modèle de Hug *et al.* (2006).

Le développement de *M. parvicella* serait favorisé par la présence de composés azotés dans le système, tels que l'ammonium ou les nitrates, notamment lorsque les réactions de nitrification et de dénitrification sont incomplètes (Rossetti *et al.* 2005). En effet, *M. parvicella* possède une voie métabolique lui permettant d'utiliser l'ammonium et aurait une activité de dénitrification partielle. Il pourrait utiliser les nitrates comme accepteurs d'électrons et partiellement les nitrites (Andreasen and Nielsen 1998; Hesselsoe *et al.* 2005; McIlroy *et al.* 2013). Cette activité de dénitrification lui permettrait de survivre à de longues périodes d'exposition à des conditions d'anoxie mais pas de se développer (Rossetti *et al.* 2002).

*M. parvicella* aurait également la capacité de stocker des polyphosphates avec un métabolisme différent des PAO. Il n'y aurait pas de suraccumulation du phosphore avec des réserves de glycogène mais éventuellement une suraccumulation d'une autre source d'énergie comme le tréhalose (Andreasen and Nielsen 2000; McIlroy *et al.* 2013). L'assimilation du phosphore par *M. parvicella* serait favorisée en conditions limitantes en phosphate (Kornberg *et al.* 1999; McIlroy *et al.* 2013).

En conclusion, les conditions favorables au développement de *M. parvicella* sont nombreuses. Pour certaines, elles correspondent aux conditions de fonctionnement des stations à boues activées faibles charges et/ou aération prolongée.



## I.2. Les agrégats biologiques des boues activées

Les agrégats biologiques, appelés également flocs, sont très hétérogènes. Ils résultent essentiellement de l'accumulation de micro-organismes et de substances polymériques extracellulaires (EPS) qui assurent leur cohésion. Le nombre de bactéries dans les boues activées serait de l'ordre de  $10^{12}$  cellules par g MVS, ce qui représente 5 à 20 % de la fraction organique des boues (Nielsen *et al.* 2002; Nielsen *et al.* 2004). Les EPS représenteraient une fraction plus importante, de l'ordre de 40 % de la fraction organique (Frølund *et al.* 1996). Des particules organiques ou inorganiques, provenant des eaux résiduaires ou du métabolisme des bactéries, sont également présentes dans les agrégats biologiques.

### I.2.1. Caractérisation des agrégats biologiques

L'analyse granulométrique par diffraction laser montre que les agrégats ayant un diamètre de 68 à 183  $\mu\text{m}$  occupent 44 % du volume des boues activées (Jorand *et al.* 1998). Les flocs de petites tailles sont majoritaires en nombre mais la majeure partie du volume est occupée par des flocs de grande taille (Droppo *et al.* 1996; Droppo *et al.* 1997). La distribution de la taille des agrégats résulte de phénomènes dynamiques d'agrégation et de désagrégation des particules entre elles.

D'après Jorand *et al.* (1998), les agrégats se composent de macroflocs (diamètre moyen de 125  $\mu\text{m}$ ) qui peuvent se dissocier en microflocs (diamètre de 13  $\mu\text{m}$ ) pouvant être assimilés à des micro-colonies bactériennes très cohésives. Leur morphologie est globalement variable dans l'espace et le temps. Elle serait influencée par les conditions de fonctionnement de l'installation, le domaine de charge et l'âge des boues (Eriksson *et al.* (1992)). La morphologie générale des agrégats biologiques en fonction de l'âge des boues ou le domaine de charge selon ces auteurs est schématisée sur la Figure I-12.

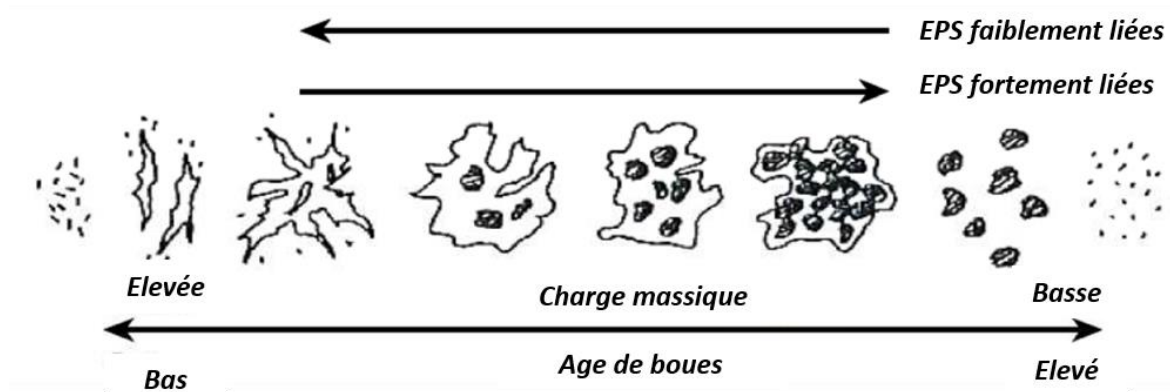


Figure I-12 : Variation de la morphologie générale des agrégats biologiques en fonction de l'âge des boues et de la charge massique  
Modèle d'Eriksson *et al.* (1992)

Ainsi, pour des âges de boues faibles, la structure des agrégats biologiques est lâche en opposition avec des structures plus denses et plus compactes pour des âges de boues plus élevés. Ces différences de comportement peuvent notamment être expliquées par la nature des forces d'interactions mises jeu. La faible cohésion des flocs pour des âges de boues faibles

(4 à 9 jours) serait due à la prédominance des interactions du type ionique. Tandis que la cohésion plus importante pour des âges de boues plus longs (16 à 20 jours) pourrait être attribuée au caractère plus hydrophobe des agrégats. La variation des forces d'interaction mises en jeu résulterait de la nature des EPS constituant les agrégats biologiques.

### **1.2.2. Cohésion des agrégats biologiques**

Le comportement d'une suspension est en partie contrôlé par un équilibre entre les interactions attractives et répulsives des particules. La théorie DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey and Overbeek) considère le potentiel d'interaction entre deux particules sphériques comme la somme des énergies potentielles du type Van der Waals et des forces de répulsion électrostatiques de la double couche électrique (Derjaguin and Landau 1941; Verwey and Overbeek 1948). Avec l'augmentation de la force ionique du milieu, l'épaisseur de la double couche des particules décroît ce qui diminue la force de répulsion et favorise leur agglomération. Ce concept permettrait de décrire en partie le comportement des boues activées.

Cependant, plusieurs études ont mis en évidence qu'il n'était pas suffisant pour expliquer leur comportement et que d'autres interactions non-DLVO seraient impliquées notamment des interactions hydrophobes (Pavoni *et al.* 1972; Zita and Hermansson 1994, 1997). Ces interactions non-DLVO seraient notamment induites par la nature des EPS qui d'après Mikkelsen et Keiding (2002) participent activement à la structuration des floccs. En effet, elles sont essentielles à la cohésion des agrégats biologiques. Elles ont également un rôle important dans l'accumulation de nombreuses molécules, du substrat et des produits d'hydrolyse, à proximité des bactéries agrégées et participent au pouvoir tampon du milieu.

Les EPS sont essentiellement produites par la biomasse mais peuvent aussi provenir de l'influent. D'après Wilen *et al.* (2003), sur les installations recevant majoritairement des eaux résiduaires urbaines, les EPS seraient majoritairement composées de protéines (43 à 56 %), de substances humiques (26 à 39 %) et de polysaccharides (7,3 à 9,5 %). Les acides uroniques et les acides nucléiques feraient également partie de la composition des EPS mais en plus faible proportion (moins de 2 % et entre 3 et 11 %, respectivement).

Il existe deux types d'EPS. Celles faiblement liées (loosely bound EPS : LB-EPS) et celles, majoritaires, fortement liées à la biomasse des floccs (tightly bound EPS : TB-EPS). Leur proportion et leur nature varient suivant les conditions de fonctionnement de l'installation. D'après Li et Yang (2007), la proportion de LB-EPS décroît avec l'augmentation de l'âge des boues. L'augmentation de l'âge de boues entraînerait une légère diminution de la quantité de carbohydrates, ayant un caractère neutre ou hydrophile, et une augmentation de la quantité de protéines donc de l'hydrophobicité des agrégats (Liao *et al.* 2001).

De plus, selon leur proportion, les LB-EPS auraient un impact négatif sur les propriétés de floculation des agrégats biologiques et sur leur décantabilité (Li and Yang 2007; Yang and Li 2009).

Sur les installations du type boues activées faible charge, les EPS seraient d'avantage liées aux agrégats. Elles seraient plus denses et plus résistantes aux cisaillements induits par les conditions de fonctionnement des stations.

La cohésion des agrégats biologiques est assurée par de nombreuses interactions ayant lieu entre les bactéries, entre les bactéries et les polymères et entre les polymères. L'aptitude à la



floculation augmenterait avec la teneur en EPS et plus particulièrement avec l'augmentation de leur teneur en protéines, polysaccharides et ADN (Wilén *et al.* 2003). La Figure I-13 synthétise les différents composants pouvant contribuer ou non à la biofloculation des agrégats.

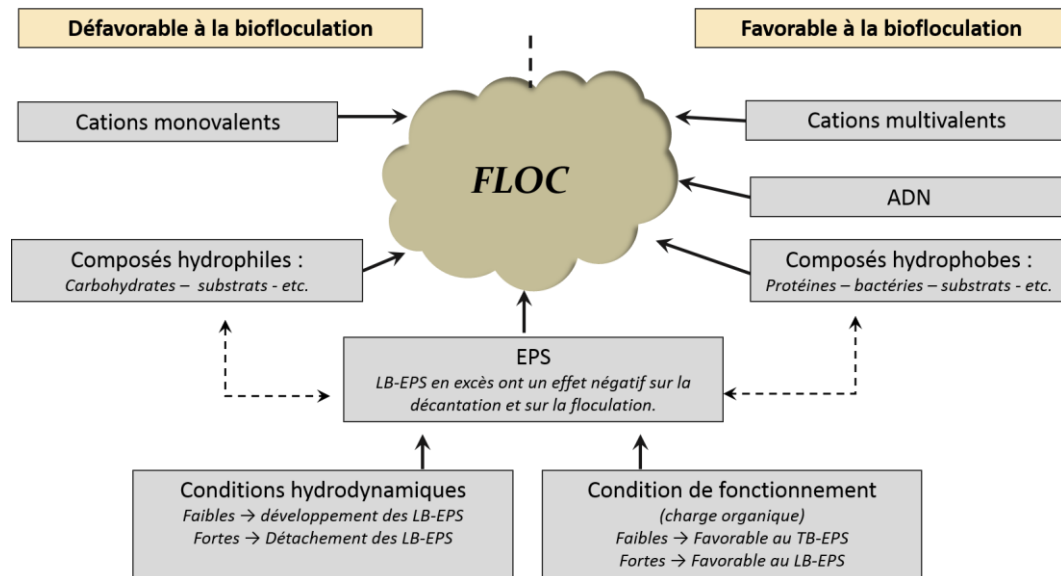


Figure I-13 : Synthèse des interactions pouvant intervenir dans la stabilisation des flocs

- Les cations

Au pH des boues activées ( $\approx 7$ ), la plupart des molécules présentes sont chargées négativement. Le modèle du « Divalent Cation Bridging (DCB) », suppose que les groupements qui contiennent les EPS chargées négativement sont liés ensemble par l'intermédiaire de cations divalents ou trivalents (Eriksson *et al.* 1992; Higgins and Novak 1997; Nielsen and Keiding 1998). Ce modèle est schématisé en Figure I-14.

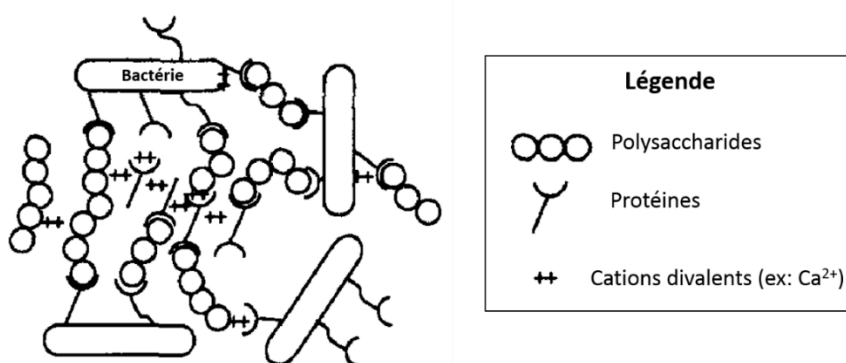


Figure I-14 : interactions entre les constituants des boues et les cations divalents – Modèle d'Higgins et Novak (1997).

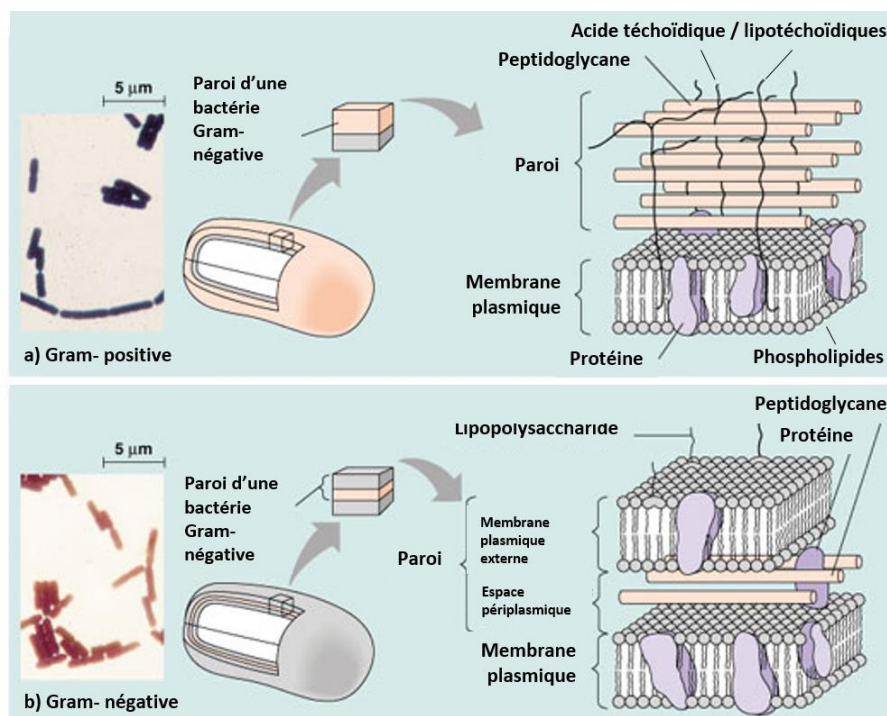
Le maillage des polysaccharides est ainsi stabilisé par la présence de cations divalents mais également trivalents (Li *et al.* 2012). Par contre, l'occupation des sites de liaison par des cations monovalents entraîne une déstabilisation des agrégats.

- L'ADN

L'ADN n'est pas un composé majoritaire des boues activées et représente 3 à 11 % de la fraction organique. Cependant, c'est un floculant naturel chargé négativement à pH 7 qui peut jouer un rôle important dans la stabilisation des agrégats biologiques (Sakka and Takahashi 1982; Palmgren and Nielsen 1996).

- La biomasse

En fonction des caractéristiques de leur paroi, les bactéries sont classées en deux groupes : les bactéries de type Gram positif ou Gram négatif. Cette classification provient de leur réponse à la coloration de Gram dont le protocole est détaillé en paragraphe II.5.1. Les bactéries qui conservent la couleur du colorant (violet) après lavage sont dites Gram positives. Elles ont généralement une paroi épaisse essentiellement constituée de peptidoglycanes. Les bactéries qui sont décolorées par les solvants sont de type Gram négatif. À l'extérieur de leur membrane plasmique se trouve un réseau de peptidoglycanes peu dense puis une seconde membrane appelée membrane externe. La composition et l'organisation de la paroi des bactéries Gram positives et Gram négatives sont décrites sur la Figure I-15.



**Figure I-15 : Composition et organisation de la paroi des bactéries Gram positives et Gram négatives**  
Extrait et traduit de Pearson Education, inc. Publishing Benjamin Cummings

Que les bactéries soient Gram positives ou Gram négatives, leur enveloppe, riche en groupements acides, est chargée négativement. Par conséquent, ces groupements peuvent interagir avec les composés cationiques présents dans le milieu.

- L'hydrophobicité

D'après Wilen *et al.* (2003), l'hydrophobicité des floccs aurait un effet positif sur la floculation et la décantation. D'après Zita et Hermansson (1997), il existerait une forte corrélation entre l'hydrophobicité des cellules et leur degré de liaison aux agrégats. Il est donc possible que la nature des bactéries et plus précisément les propriétés de leur surface jouent un rôle dans la biofloculation.

### **I.3. Les dysfonctionnements biologiques dus à une prolifération excessive de bactéries filamenteuses**

#### **I.3.1. Description des dysfonctionnements observés**

##### ***I.3.1.1. Capacité des boues à décanter***

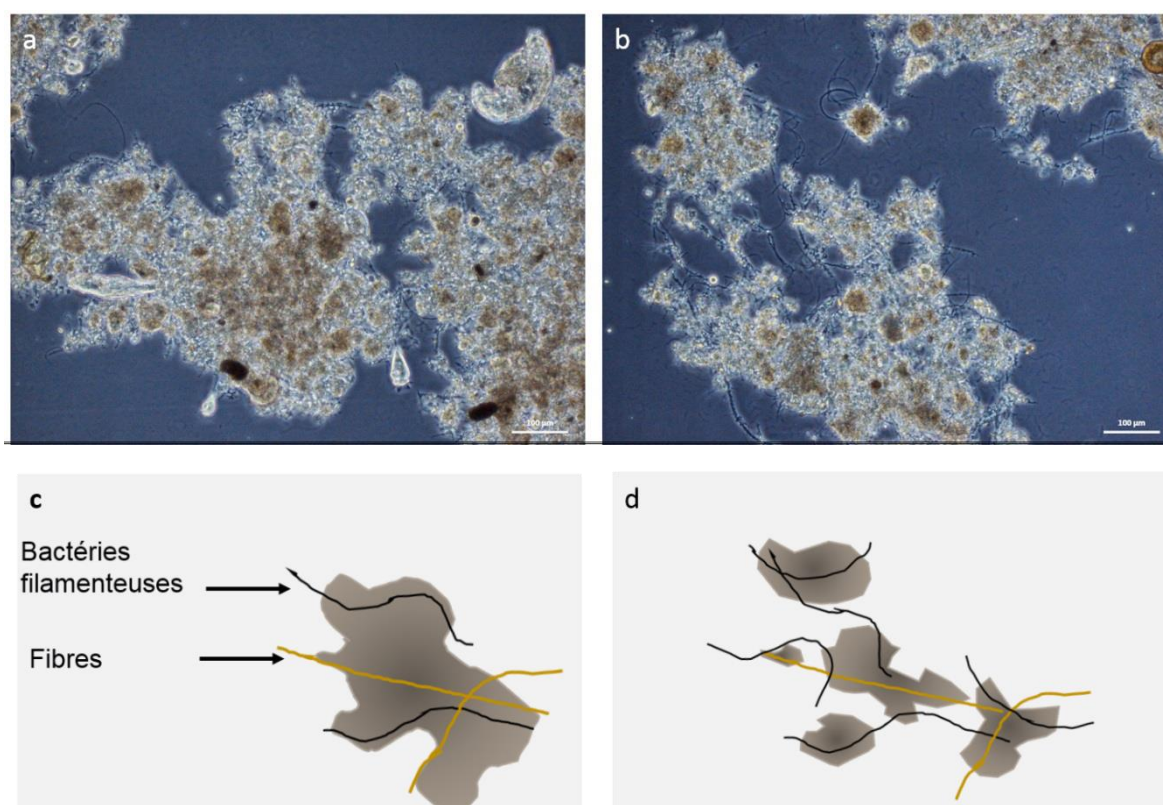
La capacité des boues à décanter (ou décantabilité) peut être évaluée en réalisant un test de décantation en éprouvette. Au bout de trente minutes, le volume de boues est relevé (VD<sub>30</sub>) et divisé par la concentration en matières en suspension (MES) du prélèvement afin de déterminer l'indice de boues (IB), qui correspond au volume occupé par 1 g de boues. Si le volume de boues décanté est supérieur à 300 mL, il est nécessaire de diluer les boues avec les eaux de sortie. Si cette démarche n'est pas réalisée, l'indice est appelé indice de Mohlman (Canler 2005).

Les difficultés de décantation surviennent le plus souvent à partir d'indices de boues supérieurs à 150 mL g<sup>-1</sup>. Afin de préciser la cause de ces problèmes, des observations microscopiques permettent d'étudier la morphologie des agrégats et d'évaluer notamment la quantité de bactéries filamenteuses présentes. En effet, les problèmes de décantation peuvent avoir plusieurs causes :

- Croissance dispersée et non floculée de la biomasse souvent associée à une faible proportion d'EPS due à des charges massiques trop élevées ou à la présence de toxiques dans l'influent ;
- Agrégats de taille insuffisante pouvant être associés à des âges de boues trop élevés ou à des contraintes hydrodynamiques trop importantes causées par exemple par la vitesse de rotation des aérateurs de surface ;
- Agrégats visqueux souvent associés à une concentration excessive d'EPS et/ou à la présence de colonies de *zooglées* ;
- Foisonnement des boues dû à un développement excessif de bactéries filamenteuses.

### 1.3.1.2. Le foisonnement des boues

Le foisonnement des boues est le phénomène le plus souvent à l'origine des problèmes de décantation (Tandoi *et al.* 2006). La décantation des boues est altérée par la présence importante de bactéries filamenteuses qui entraînent l'ouverture de la structure des agrégats biologiques et/ou la création de pontages inter-flocs. La morphologie d'un floc normal observée en microscopie (contraste de phase) est représentée sur la Figure I-16.a et celle d'un agrégat dit diffus – en présence de bactéries filamenteuses – sur la Figure I-16.b. Pour une meilleure compréhension des phénomènes, une représentation schématisée est également donnée sur la Figure I-16.C pour un agrégat dit normal et pour un floc diffus sur la Figure I-16.d.



**Figure I-16 : Observations microscopiques en contraste de phase d'un agrégat biologique normal (a) et d'un agrégat biologique diffus (b) – Schématisation d'un agrégat biologique normal (c) et diffus (d)**

L'altération de la morphologie des agrégats peut entraîner des pertes de boues au niveau du décanteur secondaire et un non-respect des niveaux de rejet, des difficultés à maintenir des concentrations stables en biomasse dans l'installation ainsi que des difficultés pour la déshydratation des boues (Tandoi *et al.* 2006).

L'impact des bactéries filamenteuses sur la morphologie des flocs peut différer suivant les espèces impliquées. *M. parvicella* ou Type 0092 provoquent l'ouverture du floc tandis que *Thiothrix sp.* forme des pontages entre les agrégats. Certaines bactéries peuvent entraîner ces deux phénomènes comme Type 0041/0675 (Jenkins *et al.* 2004).

### ***1.3.1.3. Le moussage***

Ce type de dysfonctionnement se caractérise par la présence d'une couche de mousses stables et denses en surface des bassins ainsi que par la présence de flottants au niveau du clarificateur. Il résulte de la stabilisation entre trois éléments : l'air, l'eau et les cellules bactériennes. Le moussage peut être causé par la production excessive d'EPS (lipides, protéines ou carbohydrates), par la présence de composés tensio-actifs dans les eaux usées ou par la prolifération excessive de bactéries filamenteuses dont les parois sont très hydrophobes. Les bactéries hydrophobes, et éventuellement les agrégats auxquels elles sont liées, ont tendance à être entraînées à la surface des bassins sous l'action de l'aération. De par leur caractère hydrophobe, *M. parvicella* et *Mycolata* sont les bactéries filamenteuses le plus souvent à l'origine de ce type de dysfonctionnement (Jenkins *et al.* 2004).

L'accumulation de biomasse dans les mousses entraîne des difficultés à maintenir stable la concentration en matières en suspension (MES) dans l'installation et à contrôler l'âge de boues (Tandoi *et al.* 2006).

Des flottants en surface des clarificateurs peuvent être induits par des phénomènes de dégazage en présence de réactions de dénitrification ou en l'absence de dégazeur en amont du clarificateur.

### **1.3.2. Occurrence des dysfonctionnements en France et identification des bactéries filamenteuses impliquées**

Différentes enquêtes ont été réalisées en France par le Cemagref au cours des 30 dernières années. La première, réalisée en 1984 auprès de 3 860 stations à boues activées suivies par les SATESE (Service d'Assistance Technique aux Exploitants de Stations d'Épuration), a montré que 25 % d'entre elles rencontraient des problèmes de foisonnement (Pujol and Boutin 1989). Une deuxième enquête réalisée auprès d'environ 6 000 installations également suivies par les SATESE, a montré que 20 % d'entre elles rencontraient des problèmes de moussage (Pujol *et al.* 1991).

La dernière enquête sur ce sujet a été réalisée entre 1999 et 2001 auprès d'environ 1 000 stations suivies par les SATESE. Elle a montré que 25 % d'entre elles avaient des indices de boues caractéristiques de problème de décantation (Graveleau *et al.* 2005). Cette analyse a été en partie confirmée par les membres des SATESE enquêtés qui avaient estimé les problèmes de décantation à 30 % et de moussage à 20 %. Ces résultats montrent qu'en 15 ans les problèmes de moussage et de décantation sont toujours aussi importants sur les installations.

L'identification des bactéries filamenteuses majoritaires observées sur ces installations est listée dans le Tableau I-2 selon leur rang, la fréquence est précisée entre parenthèses lors que celle-ci est connue.



**Tableau I-2 : Bactéries filamenteuses majoritairement identifiées lors de dysfonctionnements biologiques**

	Foisonnement		Moussage
	Pujol <i>et al.</i> (1989)	Graveleau <i>et al.</i> (2005)	Pujol <i>et al.</i> (1991)
Type 0041/0675	1	4 (6 %)	2 (26 %)
Type 0092	2	1 (47 %)	4 (5 %)
<i>Microthrix parvicella</i>	3	2 (26 %)	1 (55 %)
<i>Thiothrix sp.</i>	4 et 5	3 (11 %)	-
<i>Sphaerotilus natans</i>	6	0 % en majoritaire 2 % en secondaire	-
Mycolata ( <i>Nocardia sp.</i> )	-	0 % en majoritaire 5 % en secondaire	3 (14 %)

Les bactéries filamenteuses le plus souvent à l'origine des dysfonctionnements biologiques sont *M. parvicella*, Type 0041/0675, Type 0092 et *Thiothrix sp.* Le morphotype 0041/0675 peut correspondre à des bactéries du phylum *Chloroflexi* ou TM7 et le morphotype 0092 correspond au phylum *Chloroflexi*. Ces résultats sont cohérents avec l'étude menée récemment sur la diversité des bactéries filamenteuses dans les stations d'épuration danoises par Mielczarek *et al.* (2012). La croissance des bactéries du Type 0041/0675, Type 0092 et *M. parvicella* est favorisée par des charges massiques inférieures à 0,2 kg DBO<sub>5</sub> (kg MVS)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> et la présence de substrat lentement biodégradable (Richard 1989; Eikelboom 2000; Jenkins *et al.* 2004).

En ce qui concerne *Thiothrix sp.*, qui a été identifié en France comme le troisième filament le plus fréquent lors des dysfonctionnements biologiques, il serait notamment caractéristique de la présence d'effluent septique, de sous-aération des boues et/ou d'une carence en nutriments (Pujol *et al.* 1990; Jenkins *et al.* 2004).

L'occurrence des dysfonctionnements était tout aussi importante dans les pays d'Europe entre 1990 et 2000 et les bactéries filamenteuses les plus fréquentes étaient *M. parvicella*, *Nostocoida limicola*, Type 0092 et Type 0041/0675 (Pujol and Canler 1989; Pujol *et al.* 1991; Eikelboom *et al.* 1998; Krhutkova *et al.* 2002; Krhutkova *et al.* 2005). Leur rang est variable d'un pays à l'autre, à l'exception de *M. parvicella* qui demeure au premier ou au second rang dans de nombreux pays (Jenkins *et al.* 2004).

### **I.3.3. Causes potentielles des dysfonctionnements biologiques et recommandations pour limiter leur occurrence**

#### ***I.3.3.1. Causes possibles des dysfonctionnements biologiques***

Les deux causes majeures identifiées lors de la dernière enquête réalisée par le Cemagref correspondent à de fortes variations de la charge hydraulique (parfois causées par des eaux parasites) et de la charge organique (saisonnière ou industrielle) (Graveleau *et al.* 2005).

D'autres facteurs sont été également cités (Graveleau 2002) :

- Nature de l'influent : septicité, richesse en matières grasses ;
- Équipement de la station : vétusté, sur-dimensionnement du clarificateur, absence de prétraitement ou de puits de dégazage en amont du clarificateur, système d'aération ;
- Filière de traitement des boues sous-dimensionnée ou absente.

Le sous dimensionnement des filières de traitement de boues peut favoriser le retour d'effluent septique en amont de la station. Associé ou non à des problèmes d'aération sur l'étage biologique, ceci peut générer des conditions favorables au développement de *Thiothrix sp.* qui a été identifié comme le troisième filament le plus fréquent lors des dysfonctionnements biologiques en France (Canler 2005; Graveleau *et al.* 2005).

### ***1.3.3.2. Recommandations pour limiter l'apparition des dysfonctionnements biologiques***

Les recommandations principales énoncées pour lutter contre la prolifération des bactéries filamenteuses consistent d'une part à modifier la nature de l'influent et d'autre part à maîtriser les conditions de fonctionnement des installations.

La nature de l'influent étant en lien avec les réseaux, les mesures sur ceux-ci permettant de limiter les eaux claires parasites ou la septicité des effluents sont recommandées (Graveleau *et al.*, (2005).

La maîtrise des retours en tête de station d'épuration d'effluents septiques provenant de la filière de traitement des boues et l'efficacité des prétraitements pour éliminer les graisses ont également un impact sur la nature des eaux usées qui sont acheminées vers les bassins biologiques (Canler 2005).

En ce qui concerne le fonctionnement des installations, les recommandations préconisent des conditions d'opération peu favorables au développement des bactéries filamenteuses, par exemple :

- Maintenir une aération homogène supérieure à 1 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> voire 2 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> pour le traitement de l'azote et de ne pas dépasser plus de 2h consécutives de non-aération en l'absence de bassin d'anoxie ;
- Assurer une bonne homogénéisation des boues dans les bassins afin d'éviter tout dépôt ou zone d'accumulation ;
- Maintenir une charge massique stable au cours du temps, ajuster la recirculation et l'extraction des boues en conséquence.

La caractérisation des bactéries filamenteuses impliquées permet également d'identifier plus précisément les facteurs déclencheurs du foisonnement.

## I.4. Techniques de lutte contre le développement excessif des bactéries filamenteuses

### I.4.1. Une solution préventive : la zone de contact

La zone de contact est un ouvrage de faible volume placé en amont des bassins biologiques, dans lequel sont acheminées une fraction des boues issues de la recirculation et les eaux prétraitées. Ce procédé, dont le schéma de principe est donné sur la Figure I-17, permet d'exercer une pression sélective et de favoriser les bactéries du floc par rapport aux bactéries filamenteuses.

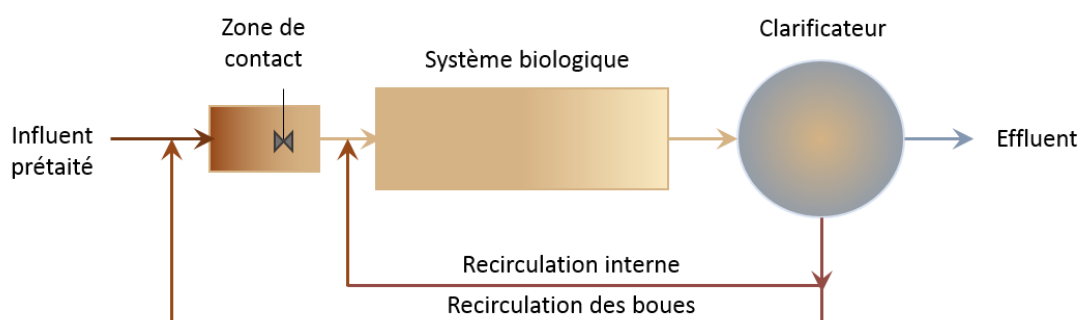


Figure I-17 : Schéma de principe de la zone de contact

D'autres configurations de la zone de contact peuvent être envisagées avec notamment son intégration partielle dans les bassins d'anoxie ou aérés. Elle doit être dimensionnée pour assurer un temps de contact de l'ordre de 10 min et une charge de l'ordre de 100 mg de DCO soluble par gramme de MES, le mélange doit être brassé en continu et si possible aéré (Pujol *et al.* 1990; Pujol and Canler 1994).

L'efficacité de la zone de contact est assez controversée. D'après Pujol et Canler (Pujol and Canler 1994), cette technique permet de diminuer de façon significative l'indice de boues dans 91 % des cas et l'apparition des mousses dans 75 % des cas. D'autres travaux ont également montré l'efficacité de cette technique notamment en conditions aérobies et anoxiques (Madoni and Davoli 1993; Davoli *et al.* 2002). Des études ont également montré une efficacité très modérée de ce système aussi bien en conditions aérobies qu'anoxiques (Mamais *et al.* 1998; Lebek and Rosenwinkel 2002).

D'après Noutsopoulos *et al.* (2010, 2012), la faible efficacité des zones de contact pour le contrôle de *M. parvicella* serait due au fait qu'elles créent des phénomènes de compétition vis-à-vis du substrat facilement biodégradable. Or, ce n'est pas le substrat utilisé par *M. parvicella*. Les capacités d'assimilation des LCFA comparables entre *M. parvicella* et les bactéries du floc ont été mesurées par ces auteurs. D'après eux, il n'y aurait pas de phénomène de compétition suffisant pour assurer le contrôle de *M. parvicella*, et ce quelles que soient les conditions d'aération. D'après les mêmes études, une des meilleures options pour limiter la croissance de *M. parvicella* est d'appliquer une forte charge organique sur l'ensemble du procédé, ce qui n'est pas compatible avec un traitement poussé de l'azote en boues activées. Une autre alternative est d'utiliser des réacteurs à flux piston ou des systèmes du type SBR en appliquant des âges de boues faibles.



En effet, des âges de boues supérieurs à 20 jours correspondant à des charges massiques faibles ( $0,05 - 0,1 \text{ kg DBO}_5 (\text{kg MVS})^{-1} \text{ j}^{-1}$ ), constituent également des conditions favorables à *M. parvicella* sur ce type de procédé (Mallouhi and Austermann-Haun 2014).

La zone de contact est une solution préventive et ne permet pas de pallier les dysfonctionnements de manière systématique. Leur implantation n'est pas toujours possible sur des installations existantes et leur utilisation pour limiter la croissance de *M. parvicella* n'est pas toujours probante. Il est donc également important que des traitements curatifs puissent être mis en place sur ces installations.

#### **I.4.2. Différents traitements curatifs**

##### **I.4.2.1. La chloration**

Une des solutions curatives les plus utilisées est l'injection de produits oxydants comme le chlore. L'objectif est d'appliquer une dose qui permet de casser par oxydation les bactéries filamenteuses présentes dans le liquide interstitiel et en surface des agrégats biologiques, sans que les molécules ne diffusent à l'intérieur de ces derniers et endommagent la biomasse épuratrice. L'action du chlore entraîne une déformation des cellules qui se vident créant ainsi des zones de rupture (Wanner 1994).

Cependant, une dose trop importante et/ou appliquée sur une trop longue période peut avoir des impacts négatifs sur le fonctionnement de la station, notamment l'inhibition du relargage du phosphore en zone anaérobie, la perte de la nitrification, un phénomène de défloculation des agrégats et l'augmentation de la DCO soluble entraînant une altération des rendements épuratoires (Wakefield and Slim 1988; Wagner *et al.* 1994; Wanner 1994; Jenkins *et al.* 2004). En cas de surdosage, le liquide interstitiel devient trouble et chargé en débris divers (flocs altérés, débris cellulaires). Par conséquent, il est recommandé de ne pas dépasser la dose de  $6 \text{ g Cl}_2 (\text{kg MVS})^{-1} \text{ j}^{-1}$  durant quelques jours. Des dosages plus élevés ( $10$  à  $12 \text{ g Cl}_2 (\text{kg MVS})^{-1} \text{ j}^{-1}$ ) peuvent être appliqués ponctuellement pour une action rapide mais au détriment des rendements épuratoires (Jenkins *et al.* 2004).

Le dosage appliqué peut être variable d'une station à une autre car il dépend de nombreux facteurs et notamment du type de filament à éliminer. *Thiothrix sp* est sensible à la chloration tandis que *M. parvicella* et *Nostocoida sp.* sont des bactéries plutôt résistantes (Jenkins *et al.* 2004, Lakay *et al.* 1988). En effet, d'après l'étude de Lakay *et al.* (1988), *M. parvicella* nécessiterait des doses de chlore plus fortes ( $8 \text{ g Cl}_2 (\text{kg MVS})^{-1} \text{ j}^{-1}$ ) durant des périodes d'expositions plus longues ( $> 12$  jours) que les autres bactéries filamenteuses au détriment des conditions opératoires (impacts sur la microfaune, défloculation).

La chloration est une technique rapide à mettre en place et peu coûteuse, mais outre un dosage délicat, les dérivés chlorés sont toxiques pour l'environnement. Certains pays considèrent cette utilisation uniquement comme mesure d'urgence (ATV 1989).

### ***1.4.2.2. L'ajout de substances lestantes***

L'objectif d'ajouter des substances dites lestantes est d'augmenter la densité des agrégats afin d'augmenter leur vitesse de décantation. La réponse est en générale rapide, de l'ordre de quelques jours, mais peut engendrer des contraintes d'exploitation (augmentation de la turbidité, dépôts en fond d'ouvrages pouvant colmater les rampes d'aération, augmentation de la fraction minérale et de la production de boues). Il est donc recommandé d'avoir recours à ce traitement sur des périodes courtes (1 à 2 semaines) (Canler and Julien 2010).

Les solutions commerciales se caractérisent par une masse volumique supérieure à 1 kg L<sup>-1</sup> et par une nature hydrophobe afin d'optimiser l'adhésion des particules aux agrégats tout en évitant leur accumulation dans le liquide interstitiel. Les produits les plus adaptés sont la cendre, le talc (silicate de magnésium) et d'autres composés minéraux comme les carbonates de calcium (Bidault *et al.* 1997; Clauss *et al.* 1998; Canler and Julien 2010).

Cette solution ne peut être que temporaire et dans l'attente d'identifier la cause du dysfonctionnement. Il s'agit en effet d'une action physique modifiant les caractéristiques des boues, qui ne résout pas le problème biologique.

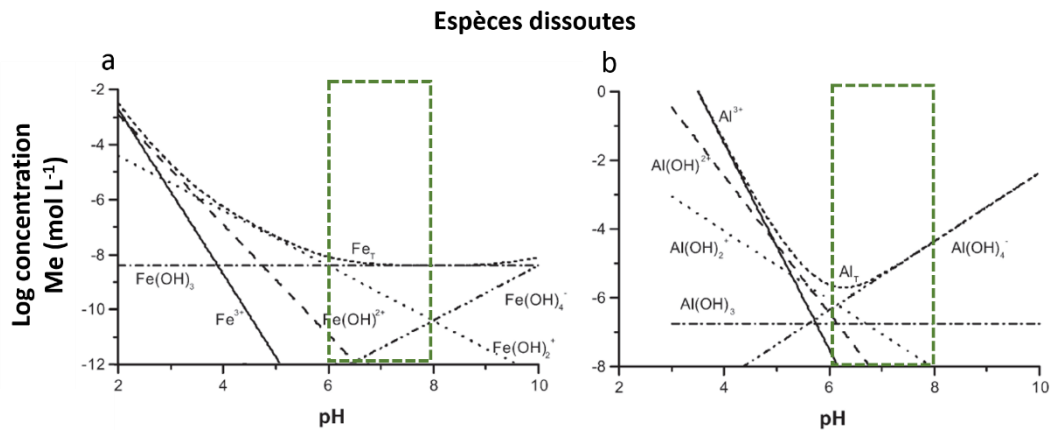
### ***1.4.2.3. L'ajout de coagulants***

Les coagulants cationiques permettent une déstabilisation des particules améliorant ainsi leur agglomération en floc et leur sédimentation. Les produits utilisés sont les chlorures d'aluminium ou de fer (MeCl<sub>3</sub>), les sulfates d'aluminium (Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>) ou de fer (FeSO<sub>4</sub>) ou les polymères organiques (chlorure de polyaluminium (Al<sub>m</sub> (OH)<sub>n</sub> Cl<sub>3m-n</sub>)<sub>x</sub> – PAX 18 et PAX-14 contenant respectivement 18 % et 14 % d'Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>).

Sur les stations d'épuration, les sels métalliques (chlorures ou sulfates d'aluminium ou de fer) sont également utilisés afin de réaliser une déphosphatation physico-chimique par précipitation partielle ou totale du phosphore. Ils peuvent aussi être utilisés pour lutter contre le développement excessif de bactéries filamenteuses. D'après la littérature, les sels d'aluminium auraient un impact spécifique sur *M. parvicella* (Roels *et al.* 2002; Paris *et al.* 2005). Cet aspect est plus amplement détaillé dans le paragraphe 1.4.2.3.1.

#### ***1.4.2.3.1. Ajout de sels métalliques dans les boues activées***

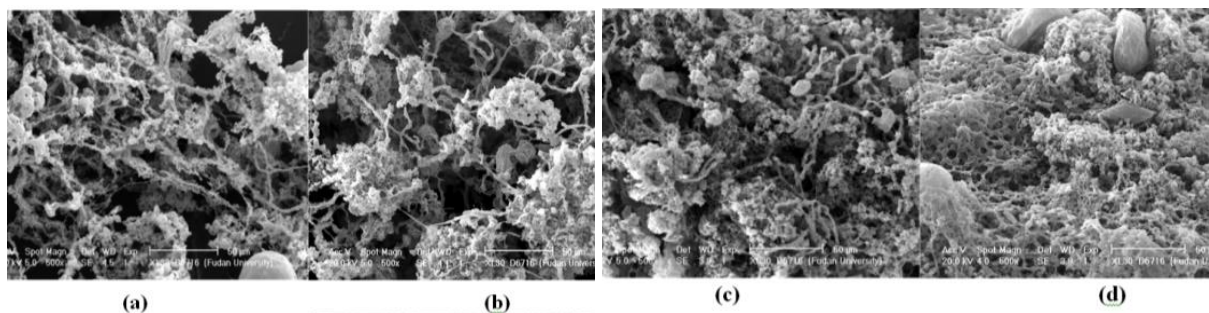
Au pH des boues activées (supérieur à 7), les sels métalliques une fois injectés sont immédiatement hydrolysés. L'aluminium est hydrolysé en hydroxyde d'aluminium, sous sa forme neutre [Al(OH)<sub>3</sub>] ou ionisée [Al(OH)<sub>4</sub>]<sup>-</sup> (Figure I-18). Ces complexes s'adsorbent sur la surface des particules pour former une couche de précipité amorphe sur laquelle les phosphates complexeraient (Smith *et al.* 2008; Szabo *et al.* 2008). Les sels d'aluminium et de fer auraient globalement la même efficacité à l'exception des solutions d'aluminium très polymérisées qui seraient moins efficaces pour la déphosphatation physico-chimique (Szabo 2008). Pour des pH supérieurs à 7, des ratios [Me]<sub>ajouté</sub>/[PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>]<sub>Influent</sub> compris entre 1,3 et 3,2 permettent d'obtenir des concentrations en phosphore soluble résiduel inférieures à 1 mg L<sup>-1</sup> selon les conditions de fonctionnement de l'installation ([PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>]<sub>Influent</sub>, alcalinité, conditions d'agitation, etc.) (Szabo *et al.* 2008).



**Figure I-18 : Diagramme de solubilité du fer (Fe) (a) et de l'aluminium (Al) (b) en fonction du pH**  
**Encadrement en vert de la gamme de pH correspondant aux boues activées (Duan and Gregory, 2003)**

Outre leur contribution à la déphosphatation physico-chimique, les sels métalliques contribuent à favoriser l'agglomération des particules. Il s'agit de mécanismes de coagulation-flocculation dits rapides (« sweep coagulation ») par opposition aux mécanismes de neutralisation des charges de surface, plus lents et existants pour des pH plus faibles (Duan and Gregory 2003).

Par conséquent, les impacts majeurs des sels métalliques sur les boues activées incluent la formation d'agrégats denses, l'augmentation de leur taille, la diminution de la turbidité du liquide interstitiel et l'amélioration des conditions de déshydratation des boues après extraction (Li *et al.* 2012). Des observations réalisées en microscopie électronique à balayage (MEB) montrent que le maillage de la matrice constituant les floccs est relativement lâche (Figure I-19.a). Après ajout de cations, le maillage de la matrice est d'autant plus resserré que la valence du cation est élevée en réduisant notamment la proportion des EPS faiblement liés (Li *et al.* 2012) (Figure I-19. b, c et d).



**Figure I-19 : Observation MEB – mise en évidence de l'effet flocculant des cations trivalents**  
**a : boues activées sans ajout de cations – b : boues activées flocculées en présence de Ca (2 mEq L<sup>-1</sup> soit 40 mg Ca L<sup>-1</sup>)**  
**c : boues activées flocculées en présence d'Al (2 mEq L<sup>-1</sup> soit 18 mg Al L<sup>-1</sup>) - d : boues activées flocculées en présence de Fe (2 mEq L<sup>-1</sup> soit 37 mg Fe L<sup>-1</sup>) - Source : (Li *et al.* 2012)**

#### *1.4.2.3.2. Efficacité des sels métalliques pour le contrôle du foisonnement des boues et du moussage*

Plusieurs auteurs ont étudié l'efficacité d'ajouts de sels métalliques pour lutter contre les dysfonctionnements biologiques associés au développement de bactéries filamenteuses. Le Tableau I-3 résume les doses appliquées et les principales conclusions tirées de ces essais.

D'après ces mesures, il semblerait qu'à dose identique, les sels de fer soient moins efficaces que les solutions à base de sulfate d'aluminium, elles-mêmes moins efficaces que les solutions de polyaluminium, pour lutter contre le foisonnement induit par *M. parvicella* et ses effets associés sur l'indice de boues et le moussage.

D'après Roel *et al.* (2002), l'ajout de polyaluminium à la dose de 1,5 à 4,5 g Al (MES)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> durant au moins 3 semaines permettrait de contrôler les conditions de décantation et les phénomènes de moussage en ciblant spécifiquement *M. parvicella* tout en préservant les autres populations bactériennes.

Tableau I-3 : Synthèse des études ayant comparé l'efficacité de l'ajout d'aluminium et de fer pour le contrôle du foisonnement des boues

Bactéries filamenteuses dominantes	Nature des essais (Echelle)	Produit ajouté	Doses appliquées	Durée	Conclusions / commentaires	Référence
<i>M. parvicella</i>	Suivi de différentes files d'une même station	PAX-16	1,7 - 4,8 g Al (kg MES) <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> 63 –177 mmol (kg MES) <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup>	17 jours	↘ IB ↘ Mousses	Neyman <i>et al.</i> (2003)
		PIX-113 (sulfate ferrique)	6,2-9,3 g Fe kg <sup>-1</sup> MES j <sup>-1</sup> 116 –167 mmol (kg MES) <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup>	11 jours	→ IB →Mousses	
<i>M. parvicella</i> et/ou <i>Gordonia amarae</i>	Essais laboratoire réalisés à partir de mousses prélevées sur deux stations durant 14 mois	FeCl <sub>2</sub>	* 30 -35 g Fe (kg MES) <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> 437 – 627 mmol (kg MES) <sup>-1</sup>		Faible contrôle du moussage	Mamais <i>et al.</i> (2011)
		FeCl <sub>3</sub>	* 25,6 -34,2 g Fe (kg MES) <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> 459 – 613 mmol (kg MES) <sup>-1</sup>			
		Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	*26-30 g (kg MES) <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> )			
		Polyaluminium	* 6,6 - 11,5 g Al kg <sup>-1</sup> MES j <sup>-1</sup> 245-427 mmol (kg MES) <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> )		Contrôle du moussage - Formation d'agrégats plus compacts et plus denses.	
		Polymère cationique	* 4,4- 3,5 g kg <sup>-1</sup> MES j <sup>-1</sup>			
Type 0092 et <i>Thiothrix sp.</i> <i>Thiothrix sp.</i> (seul et peu abondant)	Pilote ensemencé par des boues activées issues d'une STEP traitant des ERU - influent synthétique	FeSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	30 mg Fe L <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> 152 mmol (kg MES) <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup>	8 semaines	↘ IB ↘ IF	Agridiotis <i>et al.</i> (2007)
		AlCl <sub>3</sub>	11 mg Al L <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> 115 mmol (kg MES) <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup>	6 semaines	Pas d'amélioration observée mais l'essai, consécutif à l'ajout de fer, a été en partie biaisé.	

\* Doses requises pour réduire de 80 % la capacité des boues à mousser - et pour réduire de 80 % la concentration en MES accumulées dans les mousses

**Tableau I-4 : Synthèse des études ayant rapporté des éléments de compréhension sur le contrôle de *M. parvicella* par l'ajout de sels d'aluminium**

Nature des essais (Echelle)	Dose en aluminium	Température et indice de boues	Observations et hypothèses sur les mécanismes d'action	Référence
Test en réacteurs à partir d'échantillon de boues activées + suivi de 9 stations	PAX-14 Tests en réacteur : 0- 7-12 -23,5 et 47 g Al (MVS) <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> durant 15 min Stations : 1,5 à 45 g Al (MVS) <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup>	IB : ≈300 → ≈ 100 mg L <sup>-1</sup>	Dosage optimal sur station : 1,5 à 4,5 g Al (MES) <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> durant au moins 3 semaines. Diminution de l'abondance de <i>M. parvicella</i> et modification de sa morphologie : surface recouverte de débris – possible phénomène de lyse. Pas d'impact sur <i>Nostocoida limicola</i> et <i>Mycolata</i> .	(Roels <i>et al.</i> 2002)
Pilote alimenté par un influent réel (Q <sub>inf</sub> ≈ 6m <sup>3</sup> j <sup>-1</sup> ) et enrichi en Tween 80	AlCl <sub>3</sub> : 3,5 g Al (MVS) <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> Durée : 4 semaines	IB : 150 → 80 mL g <sup>-1</sup> Température : comprise entre 8 et 19 °C	Interaction de l'aluminium avec les substances lipophiles du milieu (substrat et surface de <i>M. parvicella</i> ) → Diminution de l'accès au substrat. Diminution de l'abondance de <i>M. parvicella</i> et modification de sa morphologie : Gram-variable, filaments plus courts, etc. Effet de l'aluminium limité à la période d'application.	(Paris <i>et al.</i> 2005)
Echantillons collectés sur des installations avec et sans <i>M. parvicella</i>	PAX-14 0-20 mg Al (g MES) <sup>-1</sup> Durée : 15 min – 2h -20h	<i>Non indiqués</i>	Internalisation de <i>M. parvicella</i> dans les agrégats biologiques probablement par neutralisation des charges. Pas d'impact observé sur l'hydrophobicité de <i>M. parvicella</i> . Réduction de l'activité des enzymes de surface du type lipase et estérase sur des boues avec et sans <i>M. parvicella</i> .	(Nielsen <i>et al.</i> 2005)
Suivi d'une installation sur 3 ans	PAX-18 0,64 – 2,13 g Al (kg de matière sèche) <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> Durée : 10 à 89 jours	IB > 150 mL g <sup>-1</sup> Température : 10 à 25 °C	Peu d'impact sur la morphologie de <i>M. parvicella</i> probablement dû à des doses faibles et/ou à des durées de traitement courtes. Diminution des mousses mais peu d'impact sur l'IB > 150 mL g <sup>-1</sup>	(Drzewicki 2009)
Echantillons collectés sur station	PAX-14 : 10 g Al (g MES) <sup>-1</sup> – Dépôts réalisés sur des lames de silice.	<i>Non étudiés</i>	Compaction de la surface externe de <i>M. parvicella</i> pouvant affecter le transfert du substrat et le renouvellement des enzymes de surface.	(Hamit-Eminovski <i>et al.</i> 2010)
Culture de <i>M. parvicella</i> sur différents milieux enrichis en Tween 40	Différent sels métalliques concentrations comprises entre 0,02 et 36,5 mM	<i>Non étudiés</i>	Détection d'une protéine membranaire impliquée dans le transport de substances hydrophiles ayant un site de fixation pour les cations polyvalents pouvant limiter la perméabilité de la protéine en fonction de la concentration en sels métalliques (aluminium comme fer). Ce mécanisme serait possible si le pH à proximité de la surface est < 6.	(Knaf <i>et al.</i> 2013)

#### 1.4.2.3.1. Mécanismes d'action potentiels de l'aluminium pour le contrôle du foisonnement induit par *M. parvicella*

D'après les éléments de la littérature, les sels d'aluminium permettraient de limiter le moussage et le foisonnement induits par *M. parvicella*. Les principales études ayant rapporté des éléments de compréhension sur l'impact de l'aluminium pour le contrôle du foisonnement dû à *M. parvicella* sont synthétisés dans le Tableau I-4.

D'après la littérature, l'ajout d'aluminium à  $1,5$  à  $4,5 \text{ g Al (MES)}^{-1} \text{ j}^{-1}$  permettrait le contrôle du développement de *M. parvicella* en limitant l'accès au substrat ainsi que la disponibilité de son substrat préférentiel. Les mécanismes impliqués incluent :

- La diminution du substrat disponible due à l'augmentation des gradients de concentration du substrat associée à l'augmentation de la taille des agrégats ainsi qu'à l'internalisation de *M. parvicella* et/ou à une réaction des LCFA avec les sels d'aluminium ;
- La diminution de l'activité enzymatique de surface ;
- La diminution voire l'inactivation du transport membranaire et par conséquent de l'assimilation du substrat et du renouvellement des enzymes de surface.

La Figure I-20 synthétise les mécanismes d'action potentiels impliqués dans le contrôle du foisonnement de *M. parvicella* par ajout de sels d'aluminium d'après les hypothèses développées dans la littérature.

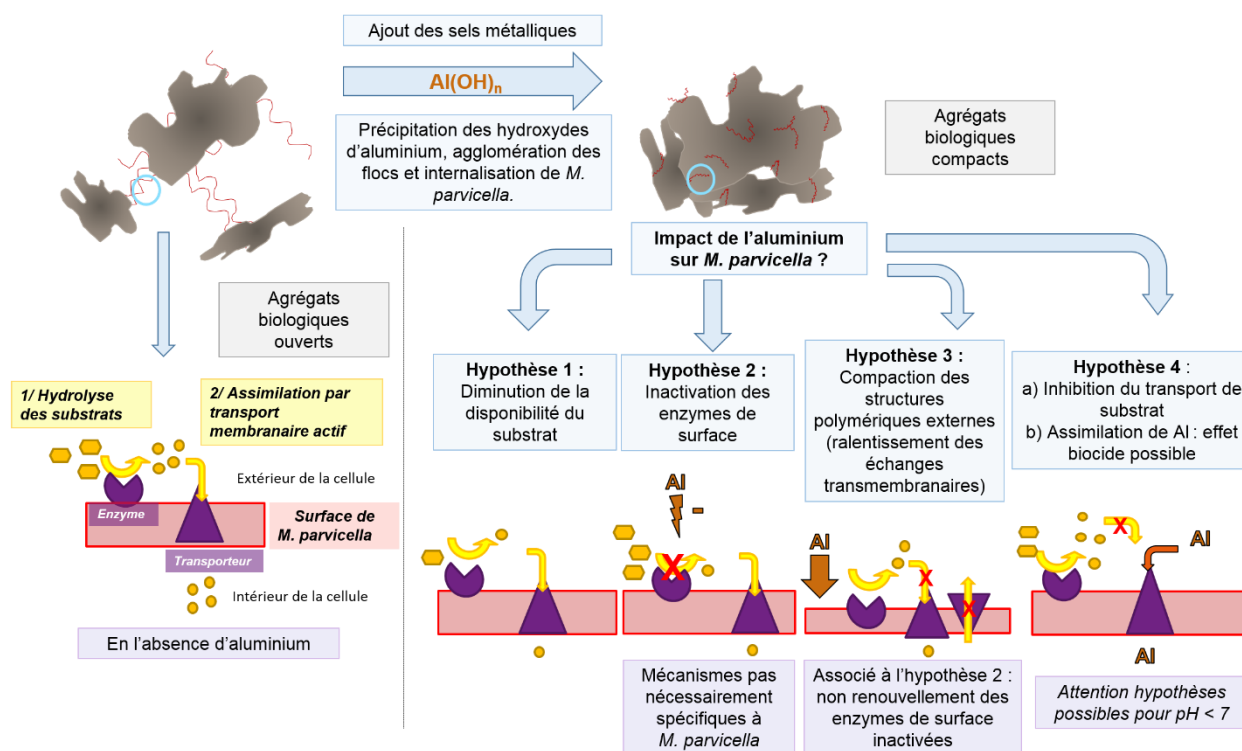


Figure I-20 : Mécanismes potentiels impliqués dans le contrôle du foisonnement de *M. parvicella* par ajout de sels d'aluminium d'après la littérature



D'après Nielsen *et al.* (2005), l'internalisation de *M. parvicella* serait due à la neutralisation des charges négatives des agrégats biologiques. En l'absence de force de répulsion, *M. parvicella* de nature hydrophobe serait attiré à l'intérieur des agrégats biologiques.

L'inactivation des enzymes de surface du type lipase et estérase pourrait ne pas affecter seulement *M. parvicella*. En effet, ce phénomène a été observé aussi bien sur des boues avec et sans *M. parvicella* (Nielsen *et al.* 2005). De plus, d'après Hamit-Eminovske *et al.* (2010), le non-renouvellement des enzymes de surface résulterait de la compaction des structures polymériques externes de *M. parvicella* par l'aluminium.

L'étude de Knaf *et al.* (2013) suppose la présence de protéines ayant un site de fixation spécifique aux cations divalents et trivalents ancrées dans la paroi de *M. parvicella*. Ces sites joueraient un rôle important dans le contrôle du foisonnement en inhibant l'assimilation de substrats (blocage du transport membranaire). Ils supposent également que les cations seraient assimilés. Dans le cas où le cation serait de l'aluminium, un effet toxique serait possible. Les tests ont été réalisés pour des pH inférieurs à 6. Le milieu des boues activées étant tamponné à un pH supérieur à 7, il est peu probable que ce mécanisme soit prépondérant dans le contrôle du foisonnement de *M. parvicella* par ajout de sels d'aluminium.

### I.5. Conclusions et objectif de l'étude

*M. parvicella* est l'une des bactéries filamenteuses les plus fréquemment identifiées lors des dysfonctionnements biologiques. Son métabolisme versatile lui permet de s'adapter aux différentes conditions opératoires des systèmes à boues activées qui alternent les conditions anaérobies relativement riches en carbone et les conditions aérobies plus pauvres. Particulièrement présent en périodes de faible température, *M. parvicella* assimile préférentiellement les acides gras volatils à longues chaînes, qui se fixeraient sur sa surface hydrophobe. Les lipides seraient ensuite hydrolysés par des enzymes de surface du type lipase et estérase avant d'être stockés et/ou assimilés par le filament.

En alternative aux solutions préventives parfois inefficaces et à la chloration lors d'épisodes de foisonnement, l'utilisation de sels métalliques permettrait une amélioration rapide des conditions de décantation et l'aluminium aurait un impact spécifique sur le contrôle du foisonnement dû à *M. parvicella*.

La plupart des études traitant ce sujet se focalise sur *M. parvicella*. Le possible impact de l'ajout d'aluminium sur d'autres bactéries filamenteuses et plus globalement sur l'ensemble de la biomasse des boues, notamment sur les bactéries nitrifiantes et déphosphatantes, n'a pas été évalué.

Afin de préciser l'impact des sels métalliques et plus précisément des sels d'aluminium sur le fonctionnement des stations à boues activées et sur leur biologie, différents essais ont donc été réalisés sur un pilote à l'échelle semi-industrielle (1 500 EH). Le coagulant choisi est une solution susceptible d'assurer le contrôle du foisonnement des boues tout en permettant une déphosphatation physico-chimique. Les solutions d'aluminium pré-polymérisées sont peu efficaces pour le traitement du phosphore et les solutions de sulfate d'aluminium peu efficaces pour le contrôle du foisonnement des boues. Le choix s'est donc porté sur des solutions à base de chlorure d'aluminium.



La démarche expérimentale a consisté à mettre en place un suivi du pilote en combinant des approches relevant du génie des procédés (analyse des données de fonctionnement, modélisation), de la microscopie (FISH, MEB, MEB-EDX) et de la biologie moléculaire (suivi quantitatif des communautés bactériennes d'intérêt, analyse de biodiversité).

En parallèle et dans l'objectif de proposer à terme des stratégies de traitement adaptées, un recensement national des solutions ayant été mises en place par les exploitants pour lutter contre les dysfonctionnements biologiques a été réalisé. De plus, le parc épuratoire ayant significativement évolué depuis la dernière enquête nationale, les données sur l'occurrence des dysfonctionnements ont été actualisées, en mettant l'accent sur le lien avec le fonctionnement des installations, notamment avec le traitement du phosphore par voie physico-chimique.

## **Chapitre II. Matériel et Méthode**

---

## II.1. Mise en place d'une enquête nationale sur les dysfonctionnements biologiques des stations d'épuration à boues activées

Une enquête nationale a été réalisée auprès des exploitants de stations d'épuration à boues activées faible charge/aération prolongée afin d'estimer l'occurrence des dysfonctionnements biologiques sur l'ensemble du territoire français et de recenser les traitements curatifs mis en place par les exploitants. Une attention particulière a également été portée aux modalités de traitement du phosphore par voie physico-chimique.

En 2012, le parc épuratoire français comptait approximativement 6 500 stations de type boues activées à faible charge (BDERU 2012) (<http://assainissement.developpement-durable.gouv.fr>). Il n'était pas envisageable de solliciter l'ensemble des exploitants de ces stations. Un échantillonnage représentatif du parc épuratoire a donc été constitué.

La première étape pour définir l'échantillonnage a consisté à identifier les critères de répartition des stations. Dans le cadre de cette étude, la capacité de traitement de l'installation et son implantation géographique ont été retenues. En effet, comme décrit au paragraphe I.1.1.1, la répartition des stations d'épuration n'est pas homogène sur le territoire français. La majorité de la charge polluante (76 %) est traitée par les stations de plus de 10 000 EH qui représentent une faible proportion des stations à boues activées (11 %). De plus, suivant la densité de population, certains départements comptent plus de stations que d'autres. Des départements ruraux comptent peu de stations ayant une capacité de traitement supérieure à 10 000 EH mais davantage de petites installations. L'inverse a été observé sur des départements plus urbanisés. La seconde étape a consisté à mettre en place une méthode d'échantillonnage respectant ces critères de répartition et à définir la taille de l'échantillon en fonction des contraintes du projet (budget, temps, objectifs). Un questionnaire a enfin été élaboré pour collecter les données requises.

### II.1.1. Définition de la taille de l'échantillon

Les résultats de l'enquête devaient pouvoir être généralisés à l'ensemble de la population ciblée afin d'estimer la proportion de stations ayant rencontré un dysfonctionnement biologique au cours de l'année 2012. De façon générale, la taille d'un échantillon est calculée suivant l'Équation II-1 (Ardilly 2006) :

$$n = \frac{t^2 \times p \times (1-p)}{m^2}$$

Équation II-1

Avec :

**n** : taille d'échantillon minimale pour l'obtention de résultats significatifs pour un événement et un niveau de risque fixé ;

**t** : niveau de confiance (la valeur-type du niveau de confiance à 95 % est 1,96) ;

**p** : proportion à estimer fixée à 50% afin de majorer la taille ;

**m** : marge d'erreur.

Pour une marge d'erreur de 3 % avec un seuil de confiance à 95 %, la taille de l'échantillon est de 1 067 stations. Elle a été arrondie à 1 000 stations.

### II.1.2. Méthode d'échantillonnage

Avec un échantillonnage aléatoire simple sur l'ensemble de la population, l'échantillon ne serait pas représentatif de la répartition des stations suivant leur capacité de traitement et leur implantation géographique. En effet, les stations ayant une importante capacité de traitement auraient la même probabilité d'être sélectionnées que les autres et seraient donc surreprésentées. L'échantillonnage par stratification permet de pallier cette hétérogénéité (Rouvière 2008).

La population mère étant caractérisée par deux critères indépendants, la charge traitée et l'implantation géographique, une seule stratification n'est pas suffisante. Lorsque la population-mère est répartie sur différentes zones géographiques, un échantillonnage en grappes est souvent réalisé. Il s'agit en fait d'une stratification suivant un critère géographique, ici le département.

Les deux méthodes d'échantillonnage ont été associées afin de générer l'échantillon. La stratification de la population mère selon la charge reçue en cinq strates a été réalisée suivant le découpage de la directive européenne n° 91/271/CEE du 21 mai 1991 relative au traitement des eaux urbaines résiduaires. Pour des raisons pratiques, la stratification selon la charge reçue a d'abord été réalisée, puis selon les départements. Le principe général de la stratification avec allocation proportionnelle est schématisé en Figure II-1.

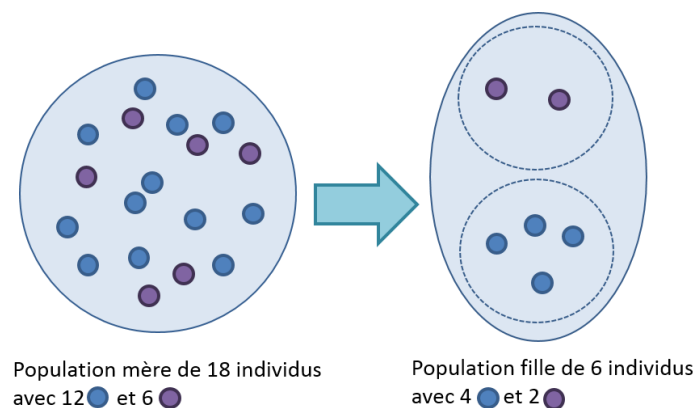


Figure II-1 : Principe de la stratification avec allocation proportionnelle

#### II.1.2.1. Échantillonnage stratifié suivant la charge traitée

Les stations ont été regroupées en différentes strates en fonction de leur charge maximale reçue en équivalents habitants. Le critère de la charge maximale a été retenu car considéré comme plus représentatif du fonctionnement réel de la station que la charge nominale.

Afin que la proportion de chaque catégorie d'individus soit respectée entre la population mère et l'échantillon, ce dernier a été réparti dans les différentes strates suivant l'Équation II-2 :

$$n_i = n \times \frac{N_i}{N}$$

Équation II-2

Avec :

**N** : nombre de stations dans la population mère ;

**N<sub>i</sub>** : nombre de stations dans la strate *i* de la population mère ;

**n<sub>i</sub>** : nombre de stations à échantillonner dans la strate *i* ;

**n** : nombre total de stations échantillonnées (1 000).

### ***II.1.2.2. Échantillonnage en grappe ou seconde stratification***

La population mère a été répartie selon les différents départements afin de tenir compte au mieux des inégalités territoriales. L'échantillon *n<sub>i</sub>* a été réparti dans les différents départements suivant la même méthode que pour la précédente stratification (équation 2). La répartition finale de l'échantillon peut s'écrire suivant l'Équation II-3 :

$$n_{ij} = n \times \frac{N_{ij}}{N}$$

*Équation II-3*

Avec

**N** : nombre total de stations de la population mère ;

**N<sub>ij</sub>** : nombre de stations dans le département *j* de la strate *i* ;

**n<sub>ij</sub>** : nombre de stations dans l'échantillon du département *j* de la strate *i* ;

**n** : nombre total de stations échantillonnées (1 000).

### ***II.1.2.3. Test et validation de l'échantillon***

Afin de valider la méthode d'échantillonnage, la valeur moyenne de la charge maximale de la strate *h* a été calculée selon l'Équation II-4 (Rouvière 2008) :

$$\mu_h = \frac{1}{N_h} \sum_{i=1}^m X_i$$

*Équation II-4*

Avec :

**μ<sub>h</sub>** : moyenne estimée de la charge maximale reçue de la strate *h* ;

**N<sub>h</sub>** : nombre total de stations de la population mère de la strate *h* ;

**X<sub>i</sub>** : valeur de la charge reçue pour la *i*<sup>ème</sup> station.

Un échantillonnage par tirage aléatoire sans remise a été réalisé de façon arbitraire 21 fois. La moyenne estimée μ<sub>h</sub> de la charge reçue a été calculée pour chaque strate et chaque tirage aléatoire. Le μ<sub>h</sub> moyen a été calculé pour chaque strate ainsi que l'écart à la moyenne vraie pour chaque μ<sub>h</sub> et pour le μ<sub>h</sub> moyen. Les résultats sont donnés dans le Tableau II-1.

**Tableau II-1 : Estimateur de la charge maximale reçue (EH)**

	Strate 1	Strate 2	Strate 3	Strate 4	Strate 5
Moyenne vraie (EH)	693	4 505	21 837	101 531	498 298
$\mu_h$ moyen	695	4 523	21 725	101 010	95 356
Ecart moyen entre $\mu_h$ moyen et la moyenne vraie (%)	0,3	0,3	0,5	0,5	81
Ecart moyen entre chaque $\mu_h$ et la moyenne vraie (%)	2	2	3	7	81

La strate 5 est très hétérogène et ne compte que 19 installations. Il n'est donc pas surprenant que l'estimation ne soit pas satisfaisante. Par conséquent, les stations recevant une charge supérieure à 250 000 EH ont été traitées indépendamment. Pour les autres strates, l'estimateur est centré sur les moyennes et peut être considéré comme étant sans biais.

Afin de valider l'échantillonnage sur l'ensemble des strates 1 à 4, la moyenne estimée est calculée suivant l'Équation II-5.

$$\mu = \frac{1}{N} \times \sum_{h=1}^4 N_h \mu_h$$

**Équation II-5**

Avec :

$\mu$  : moyenne estimée de la charge maximale reçue pour l'ensemble de la population ;

$N$  : nombre total de stations de la population mère ;

$N_h$  : nombre de stations de la strate h de la population mère ;

$\mu_h$  : moyenne estimée de la charge maximale reçue de la strate h.

L'estimateur moyen est de 5 884 EH, soit un écart à la moyenne vraie de 3 % sur les 21 tirages aléatoires. La méthode d'échantillonnage a donc été validée.

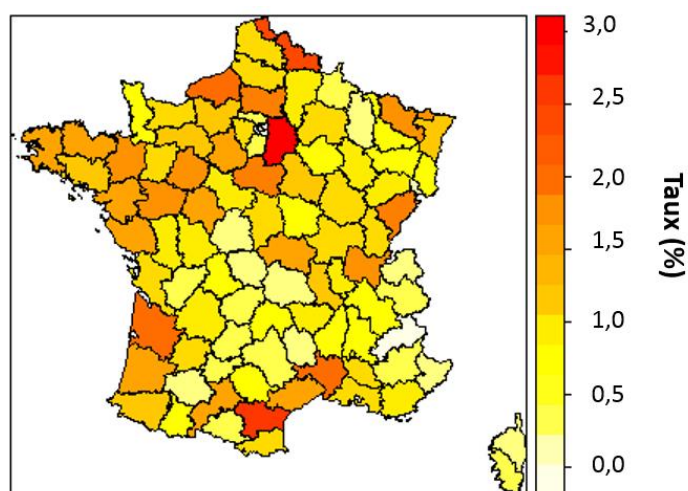
En ce qui concerne l'échantillon qui servira à l'étude, ses caractéristiques sont données dans le Tableau II-2.

**Tableau II-2 : Charge maximale reçue – moyenne par strate à l'issue de l'échantillonnage**

	Strate 1	Strate 2	Strate 3	Strate 4
Moyenne vraie (EH)	693	4 505	21 837	101 531
Moyenne échantillon (EH)	740	4 448	20 419	97 163
Ecart entre les moyennes (%)	6,8	1,3	6,4	4,3

La moyenne estimée sur l'ensemble de l'échantillon est de 5 690 EH soit un écart à la moyenne vraie de 0,5 %. Malgré un écart entre les moyennes légèrement plus important pour les strates 1 et 3, l'échantillonnage a été validé en ce qui concerne le critère de la charge.

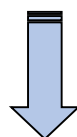
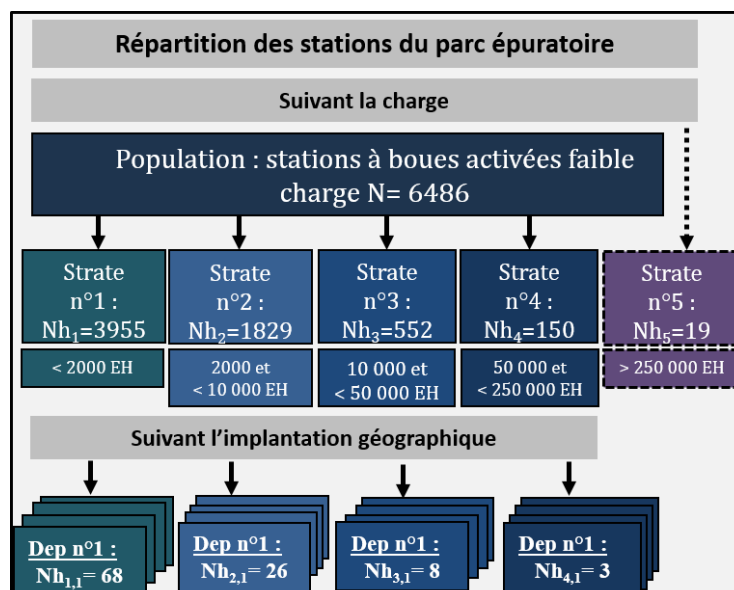
Afin de vérifier la distribution en nombre de stations sur le territoire, le taux de stations par département issu de l'échantillonnage est illustré sur la carte de France suivante (Figure II-2).



*Figure II-2 : Taux de stations par département de l'échantillon retenu*

Par comparaison avec la répartition des stations d'épuration sur le territoire français (Figure I-3), l'ensemble de l'échantillon peut être validé.

La répartition de la population mère et de l'échantillon final est schématisée sur la Figure II-3.



Echantillonnage par tirage aléatoire suivant l'Équation II-2 et l'Équation II-3.

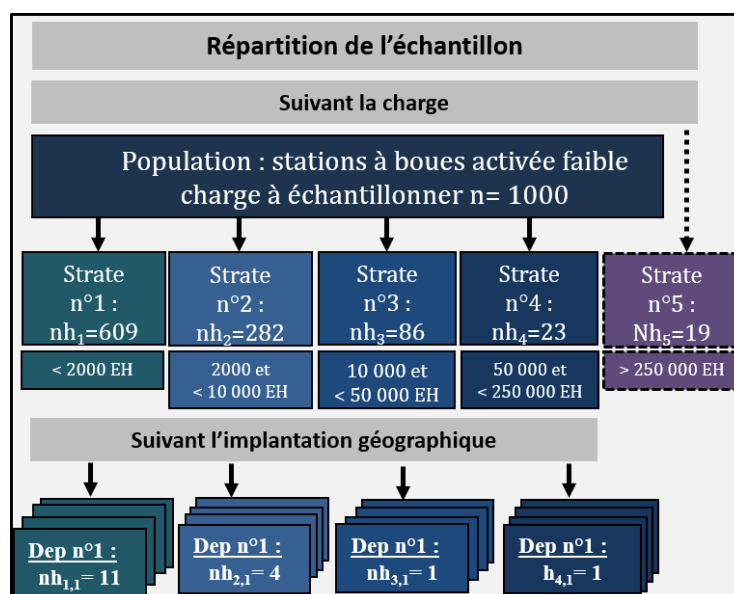


Figure II-3 : Répartition des stations d'épuration du parc épuratoire français et de l'échantillon



### II.1.3. Questionnaire

La rédaction du questionnaire est une étape essentielle dans ce type d'enquête. Il doit être facilement interprétable, court et structuré. Les objectifs doivent être clairement définis et les questions ciblées. Une attention particulière a été portée à la formulation des questions afin d'en faciliter la compréhension et la lecture. Les termes scientifiques ont été évités ou clairement définis. Pour optimiser le temps de réponse et par la suite l'exploitation des données, les questions qualitatives ont été privilégiées, *via* une liste de réponses à choix multiples. Des questions ouvertes ainsi que des zones d'expression libre ont été définies pour permettre au répondant de communiquer des informations atypiques ou complémentaires concernant le fonctionnement de la station ou les dysfonctionnements biologiques rencontrés. En plus des questions relatives à l'objet de l'étude, une partie signalétique permettant de caractériser chaque répondant a été incluse. Un questionnaire en « entonnoir » qui débute par les questions les plus évidentes a été élaboré.

L'enchaînement logique des questions est schématisé sur la Figure II-4. Le questionnaire complet peut être consulté en Annexe 1.

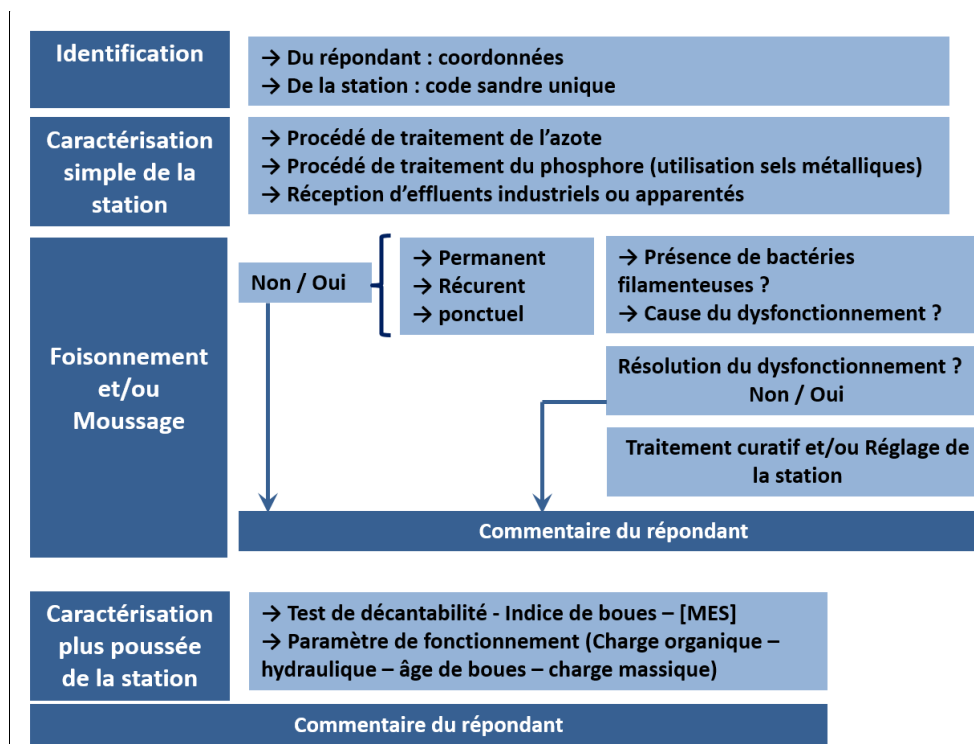


Figure II-4 : Enchaînement logique du questionnaire envoyé aux exploitants de stations d'épuration

L'interprétation des résultats est basée sur le croisement des variables à expliquer et des variables explicatives. La première étape lors de la rédaction du questionnaire a été de définir chaque variable. L'objectif de l'étude définit les variables principales qui correspondent à l'estimation de l'occurrence des dysfonctionnements biologiques et au recensement des traitements curatifs mis en place.

La fréquence d'apparition d'un dysfonctionnement au cours de l'année a été définie de la manière suivante :

- Permanents : tout au long de l'année ;
- Récurrents : durant plusieurs mois par an (3 à 6 mois) ;
- Ponctuels : durant plusieurs semaines par an, 2 à 3 semaines, parfois plusieurs fois par an.

Des variables explicatives ont été définies afin de comprendre les causes du dysfonctionnement et de vérifier la présence de bactéries filamenteuses lors du dysfonctionnement.

D'autres variables ont également été identifiées pour répondre aux objectifs complémentaires de l'étude :

- Les interventions de l'exploitant pour pallier les dysfonctionnements ;
- Une description sommaire du fonctionnement de la station afin d'établir un lien avec l'occurrence des dysfonctionnements ;
- L'utilisation de sels métalliques pour la déphosphatation physico-chimique.

#### **II.1.4. Collecte des données**

La collecte des données a été longue à mettre en place faute de l'existence d'un annuaire avec les coordonnées des stations ou des exploitants. Il a donc fallu travailler à sa création pour les stations d'intérêt. De plus, afin de garantir un taux de réponse satisfaisant, le questionnaire a été adapté aux différents interlocuteurs. Pour cela trois formats ont été développés : un format papier (Annexe 1), un format électronique *via* le site extranet d'Irstea (<http://sondage.irstea.fr/>) et un tableur Excel pour les réponses multiples.

Après une première série d'envois par courrier qui s'est avérée peu efficace, un contact téléphonique a été pris pour toutes les installations de plus de 10 000 EH. Cette méthodologie n'étant pas adaptée pour les stations inférieures à 10 000 EH de par la taille de l'échantillon, les Services d'Assistance Technique aux Exploitants de Station d'Épuration (SATESE) ont été sollicités. Les données pour la plupart des stations conventionnées ont pu être ainsi collectées. Pour les stations d'épuration non conventionnées avec les SATESE, une partie de la collecte a été réalisée *via* le GIS BioSTEP (<http://gisbiostep.irstea.fr/>), à la demande des groupes privés.

#### **II.1.5. Analyses statistiques**

Les analyses statistiques standards ont été réalisées sous R ainsi que les calculs de proportion, les comparaisons de moyenne et de proportion. Le Tableau II-3 présente les différents tests statistiques réalisés sur les résultats de l'enquête.

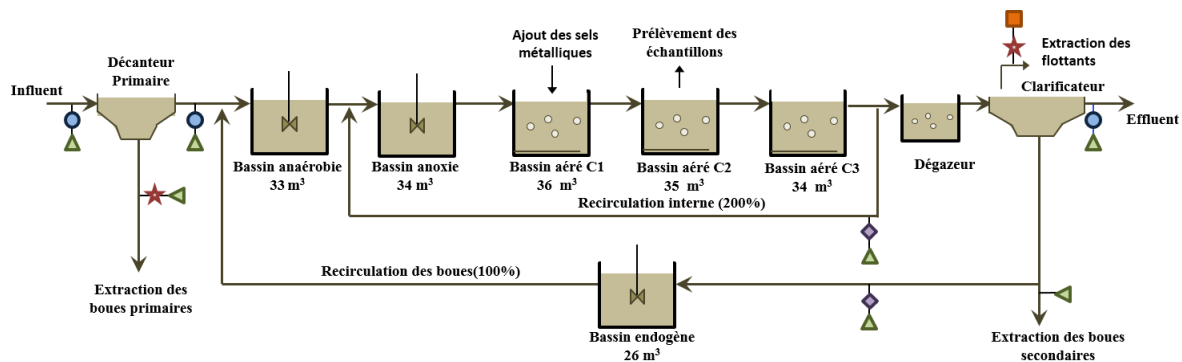
**Tableau II-3 : Tests statistiques utilisés et conditions d'utilisation**

Objectif du test	Conditions d'utilisation		Test	Référence
Indépendance entre deux variables qualitatives			Chi-2 ( $\chi^2$ )	Cornillon <i>et al.</i> (2012)
Test de normalité des données			Shapiro-Wilk	
Test d'égalité des moyennes	Hypothèse de normalité acceptée	Variance égale	Student ou ANOVA	
		Variances significativement différentes	Welch	
	Hypothèse de normalité rejetée		Kruskal-Wallis	

## II.2. Mesures réalisées sur le pilote semi-industriel

### II.2.1. Le pilote

Les essais ont été réalisés sur le pilote de déphosphatation biologique (Pilbio) exploité par le SIAAP (Service public de l'assainissement francilien) et implanté sur le site d'Achères (Seine Aval) depuis 2005. Il s'agit d'une réplique à l'échelle semi-industrielle (1/300) d'une des files de traitement de la tranche II de la station d'épuration de Valenton (94) (Rochais 2010). Ce pilote à boues activées est dimensionné pour traiter les effluents de 1 500 EH et fonctionne à très faible charge avec un débit nominal de  $264 \text{ m}^3 \text{ j}^{-1}$ . Il connaît des épisodes récurrents de foisonnement et de moussage chaque hiver depuis sa mise en route. Le schéma du pilote est donné en Figure II-5 ainsi que l'emplacement des prélèvements pour analyses et des débitmètres.



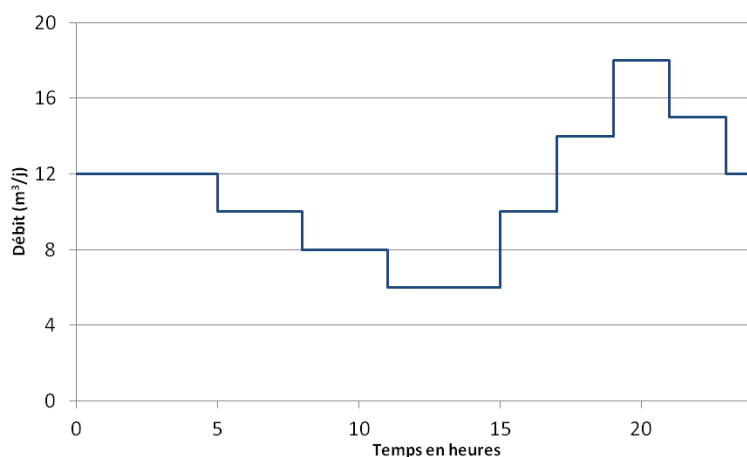
**Figure II-5 : Schéma du pilote**

Avec : ● : **prélèvement journalier et automatique des échantillons** - ◆ : **prélèvement journalier et ponctuel des échantillons** - ★ : **prélèvement ponctuel, deux fois par semaine des échantillons** - ▲ : **débitmètre** - ■ : **estimation du volume des boues raclées**.

Après un tamisage fin (1,5 mm), l'influent transite par un décanteur primaire avant d'être dirigé vers le système biologique. La zone anaérobie reçoit l'eau décantée et la recirculation des boues biologiques (100 %). Celles-ci ont séjourné auparavant dans un bassin de dénitrification endogène permettant de limiter l'apport de nitrates dans le bassin anaérobie et donc de maintenir les conditions favorables au relargage des phosphates. La zone d'anoxie reçoit les eaux du bassin anaérobie et les boues issues du bassin aéré C3 (recirculation de 200 %).

La zone aérée est constituée de trois bassins ; l'aération est assurée par des diffuseurs fines bulles et fonctionne en continu. Après une étape de dégazage, le clarificateur permet la séparation des boues de l'eau épurée. Les flottants présents sur le clarificateur sont raclés et extraits dans une cuve indépendante. Leur volume est mesuré ainsi que leur concentration en MES.

Le pilote est alimenté en eaux usées urbaines prétraitées issues de la station d'épuration Seine Aval. Le débit d'alimentation est modulé suivant une grille horaire afin de simuler la variation des débits journaliers observés sur les stations d'épuration du SIAAP. La modulation du débit d'alimentation est donnée sur la Figure II-6.



*Figure II-6 : Variation du débit d'alimentation journalier*

Le réseau d'assainissement du site de Seine aval étant de type unitaire, une augmentation du débit d'alimentation est également simulée par temps de pluie en fonction de la conductivité de l'eau brute :

- Pour une conductivité supérieure à  $1\,400\ \mu\text{S cm}^{-1}$ , la moyenne journalière du débit d'alimentation est constante et égale à sa valeur nominale ;
- Pour une conductivité comprise entre  $1\,400$  et  $1\,200\ \mu\text{S cm}^{-1}$ , un temps de pluie est simulé si la variation de la conductivité est significative sur 30 min ;
- Pour une conductivité inférieure à  $1\,200\ \mu\text{S cm}^{-1}$ , un temps de pluie est simulé.

### II.2.2. Déroulement des essais

Afin d'évaluer l'efficacité et l'impact de l'ajout de sels métalliques sur le foisonnement et le moussage, deux types de réactifs ont été testés. Le premier était composé de chlorures d'aluminium (suivi  $\text{AlCl}_3$ ) et le second d'un mélange de chlorures de fer et de chlorures d'aluminium (suivi  $\text{Al-Fe-Cl}_3$ ). L'injection des réactifs a été réalisée au niveau du premier bassin aéré (C1) et les prélèvements de liqueurs mixtes au niveau du bassin suivant (C2) afin d'assurer un mélange suffisant de la solution ajoutée dans les boues. Le déroulement des deux séries d'essais est décrit dans les paragraphes suivants.

### II.2.2.1. Ajout de chlorures d'aluminium (Suivi $AlCl_3$ )

Les caractéristiques de la solution commerciale de chlorure d'aluminium utilisée pour le suivi  $AlCl_3$  sont décrites dans le Tableau II-4.

**Tableau II-4 : Caractéristiques de la solution commerciale utilisée lors des essais  $AlCl_3$**

Caractéristiques Physico-chimiques $AlCl_3$		
Densité à 20 °C	1,310	+/- 0,005
Titre $AlCl_3$	30,5 %	+/- 1,0
Titre Al	6,15 %	+/- 1,0
Concentration Fe	< 75 ppm	
Impuretés	< 20 ppm	

Deux essais consécutifs ont été réalisés. L'objectif du premier (essai 1) était de maintenir un indice de boues inférieur à  $150 \text{ mL g}^{-1}$ . Pour cela 10 mg d'aluminium par litre d'influent ont été injectés pendant 70 jours, soit en moyenne  $1,1 \text{ g Al (kg MES)}^{-1} \text{ j}^{-1}$ . Cette dose est inférieure à celle recommandée dans la littérature pour effectuer un traitement curatif du foisonnement filamenteux ( $1,5$  à  $4,5 \text{ g Al (MES)}^{-1} \text{ j}^{-1}$ ).

Les injections ont ensuite été arrêtées durant trois semaines (état intermédiaire). Les conditions de décantation se dégradant et des mousses réapparaissant sur les bassins, un second essai (essai 2) à une dose plus importante a été mené. L'objectif était de réaliser un traitement curatif du foisonnement observé. Pour cela, une dose comprise dans la gamme recommandée dans la littérature a été injectée soit en moyenne  $3,7 \text{ g Al (kg MES)}^{-1} \text{ j}^{-1}$  avec 40 mg d'aluminium par litre d'influent durant 14 jours. Les différentes étapes de ce suivi sont synthétisées dans le Tableau II-5.

**Tableau II-5 : Doses de sels d'aluminium ajoutées lors du suivi  $AlCl_3$**

Étape du suivi	Dosage Al	Durée	Jours du suivi	Dates (2012)
État initial	0	3 semaines	0 à 18	02/01 - 20/01
Essai 1	10 $\text{mg L}^{-1}$ $1,1 \text{ g Al (kg MES)}^{-1} \text{ j}^{-1}$ $41 \text{ mmol Me (kg MES)}^{-1} \text{ j}^{-1}$	10 semaines (70 jours)	19 à 88	21/01* - 30/03**
État intermédiaire	0	3 semaines	89 à 112	31/03 – 23/04
Essai 2	40 $\text{mg L}^{-1}$ $3,7 \text{ g Al (kg MES)}^{-1} \text{ j}^{-1}$ $137 \text{ mmol Me (kg MES)}^{-1} \text{ j}^{-1}$	2 semaines (14 jours)	113 à 126	24/04* – 7/05**
État final	0	3 semaines	127 à 180	08/05 – 29/06

\* Le démarrage de l'essai a eu lieu après prélèvement des échantillons moyens journaliers et ponctuels soit vers 9h du jour n-1 indiqué.

\*\* L'arrêt des ajouts s'est effectué le jour n après le prélèvement des échantillons, excepté pour l'essai 2 où il a été arrêté le 7/05/2012 à 18h.

### II.2.2.2. Ajout de sels de fer et d'aluminium (Suivi Al-Fe-Cl<sub>3</sub>)

Pour cette série d'essais, la solution retenue se composait à la fois de sels d'aluminium et de sels de fer. Ses caractéristiques sont décrites dans le Tableau II-6.

Tableau II-6 : Caractéristiques de la solution de sels de fer et d'aluminium utilisée lors du suivi Al-Fe-Cl<sub>3</sub>

Caractéristiques Physico-chimiques		
Densité à 20°C	1,33	+/- 0,01
Titre AlCl <sub>3</sub>	24%	
Titre FeCl <sub>3</sub>	8%	
Titre Al	4,90%	
Titre Fe	2,80%	
Impuretés	< 180 ppm	

Les mesures ont été réalisées en plusieurs phases afin d'appliquer un dosage progressif. Durant la première phase (phase I), la dose injectée en Al-Fe-Cl<sub>3</sub> correspondait à la dose préconisée pour assurer une déphosphatation physico-chimique complémentaire de la déphosphatation biologique, soit 4,2 mg par litre d'influent pendant 20 jours. Lors de la phase II, la dose a été augmentée à 26 mg L<sup>-1</sup> afin d'appliquer une dose recommandée pour le contrôle du foisonnement (Roels *et al.* 2002). Ce dosage a été maintenu durant cinq semaines puis ramené au dosage initial durant quatre semaines (phase III) avant l'arrêt du traitement. Les différentes étapes de ces essais sont synthétisées dans le Tableau II-7.

Tableau II-7 : Doses de sels métalliques ajoutées lors du suivi Al-Fe-Cl<sub>3</sub>

Étape du suivi	Dosage aluminium et fer (Me)	Durée	Jours du suivi	Dates (2011)
État initial	0	6 semaines	0 à 44	01/01 – 14/02
Phase I	4,2 mg L <sup>-1</sup> 0,31 g Al (kg MES) <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> + 0,11 g Fe (kg MES) <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> 16 mmol Me (kg MES) <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup>	3 semaines	45 à 65	15/02 – 7/03*
Phase II	26 mg L <sup>-1</sup> 2,1 g Al (kg MES) <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> + 0,77 g Fe (kg MES) <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> 94 mmol Me (kg MES) <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup>	5 semaines	66 à 100	08/03 – 11/04*
Phase III	4,2 mg L <sup>-1</sup> 0,31 g Al (kg MES) <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> + 0,11 g Fe (kg MES) <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> 16 mmol Me (kg MES) <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup>	4 semaines	101 à 125	12/04 – 6/05*
État final	0	3 semaines	126 à 180	07/05 – 30/06

\* Le démarrage de l'essai a eu lieu après prélèvement des échantillons moyens journaliers et ponctuels soit vers 9h du jour n-1 indiqué l'arrêt des ajouts s'est effectué le jour n après le prélèvement des échantillons.

## II.2.3. Mesures réalisées

### II.2.3.1. Analyses des paramètres physico-chimiques

Les échantillons ont été prélevés sur la file eau (eaux usées brutes, décantées et traitées) à l'aide de préleveurs automatiques. Les échantillons de boues ont été prélevés ponctuellement. L'emplacement des points de prélèvement est décrit sur la Figure II-5.

L'analyse des paramètres physico-chimiques a été réalisée par le laboratoire de la Direction et du Développement et de la Prospective (DDP) du SIAAP accrédité COFRAC (n° 1-1452 (L)).

La concentration en oxygène dissous dans chaque bassin (sondes optiques FDO® 700 IQ) et la température au niveau de l'alimentation du pilote et sur le bassin C2 (sondes SensoLyt® 700 IQ) ont été enregistrées au cours du temps. La mesure de l'indice de boues (IB) a été effectuée tous les jours ouvrés sur les liqueurs mixtes en sortie du bassin C3 selon les recommandations de Canler (2005). Les analyses sont synthétisées dans le Tableau II-9 et les méthodes utilisées dans le Tableau II-8.

**Tableau II-8 : Méthodes d'analyse mises en œuvre par le laboratoire du SIAAP**

Paramètres	Méthode d'analyses	Pourcentage d'incertitude
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	NF EN ISO 11732	10 %
N- NO <sub>2</sub> , N-NO <sub>3</sub>	NF EN ISO 13395	10 %
NTK	NF EN 25663	10 % et 15 % pour l'effluent
MES	NF EN 872 (T90-105)	10 % et 25 % pour l'effluent
MVS	NF EN 12879	10 % et 25 % pour l'effluent
Pt	NF EN ISO 6878	15 % et 20 % pour l'effluent et l'eau décantée
P-PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	NF EN ISO 15681-2	10 %
DCO, DCOs	ISO 15705	10 % et 15% pour l'eau décantée
DBO <sub>5</sub>	NF EN 1899-1 (T90-103-1)	20 %
pH, Température	NF EN ISO 10523	5 – 10 %
TAC	NF EN ISO 9963-1	10 %
MM	Méthode interne	10 %
Al, Fe	NF EN ISO 11885	10 %

Tableau II-9 : Analyses chimiques réalisées par le laboratoire DDP du SIAAP

	Paramètres	Fréquence
<b>Eaux brutes</b>	pH – T – MES – MVS – MM – DCO – DCO <sub>5</sub> – DBO <sub>5</sub> – TAC – NTK – N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> – N-NO <sub>2</sub> – N-NO <sub>3</sub> – Pt – P-PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	Tous les jours ouvrés
	Al – Fe	1 fois par semaine durant le suivi Al-Fe-Cl <sub>3</sub>
<b>Eaux décantées</b>	pH – T – MES – MVS – MM – DCO – DCO <sub>5</sub> – DBO <sub>5</sub> – TAC – NTK – N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> – N-NO <sub>2</sub> – N-NO <sub>3</sub> – Pt – P-PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	Tous les jours ouvrés
	Al – Fe	Suivi Al-Fe-Cl <sub>3</sub> : 1 fois par semaine Suivi AlCl <sub>3</sub> : tous les jours ouvrés des jours 112 à 137 ; 1 fois par semaine à partir du jour 44
<b>Boues primaires</b>	MES – MVS – MM – Pt – DCO – NTK	Suivi Al-Fe-Cl <sub>3</sub> : 1 fois par semaine Suivi AlCl <sub>3</sub> : 2 fois par semaine à partir du jour 36
<b>Liqueurs Mixtes (LM)</b>	MES – MVS – MM – DCO	Tous les jours ouvrés
	NTK	Suivi Al-Fe-Cl <sub>3</sub> : 1 fois par semaine Suivi AlCl <sub>3</sub> : tous les jours ouvrés
	Pt	Suivi Al-Fe-Cl <sub>3</sub> : 2 fois par semaine Suivi AlCl <sub>3</sub> : tous les jours ouvrés
<b>Boues de recirculation</b>	Al – Fe	Suivi Al-Fe-Cl <sub>3</sub> : 1 fois par semaine Suivi AlCl <sub>3</sub> : tous les jours ouvrés des jours 112 à 137 ; 1 fois par semaine à partir du jour 44
	MES – MVS – MM	Tous les jours ouvrés
<b>Boues racclées</b>	DCO – NTK – Pt	Tous les jours à partir du 02.01.12
	MES – MVS – MM – Pt – DCO	2 fois par semaine
<b>Effluent</b>	NTK	2 fois par semaine à partir du suivi AlCl <sub>3</sub>
	pH – T – MES – DCO – DCO <sub>5</sub> – DBO <sub>5</sub> – TAC – NTK – N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> – NO <sub>x</sub> – Pt – P-PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	Tous les jours ouvrés
<b>Effluent</b>	Al – Fe	Suivi Al-Fe-Cl <sub>3</sub> : 1 fois par semaine Suivi AlCl <sub>3</sub> : tous les jours ouvrés des jours 112 à 137 ; 1 fois par semaine à partir du jour 44

### II.2.3.2. Prélèvement et conditionnement des échantillons pour les analyses microbiologiques

Afin de réaliser les observations microscopiques et les analyses en biologie moléculaire, des prélèvements de liqueurs mixtes ont été réalisés sur le bassin aéré C2. Pour cela au moins 1 litre de boues a été prélevé suivant les fréquences données dans le Tableau II-10. Les échantillons ont été traités en moyenne 4 h après le prélèvement puis stockés à 4°C.



Tableau II-10 : Fréquence des prélèvements pour les analyses biologiques et microbiologiques

Suivi	Phase / Essai	Fréquence	Période suivie
AlCl <sub>3</sub>	Etat initial – Essai 1 –Etat intermédiaire – Etat final	1 prélèvement par semaine	jours 0 à 148
	Essai 2	1 prélèvement tous les jours ouvrés	
Al-Fe-Cl <sub>3</sub>	Etat initial – Phase I – Phase II – Etat final	1 prélèvement par semaine	jours 33 à 149
	Phase II	2 prélèvements par semaine	

Pour les analyses en biologie moléculaire, 50 mL de liqueurs mixtes ont été centrifugés à 5 800 g durant 15 min à 4°C. Deux tubes contenant chacun 2 g de culot ont été stockés à -20°C jusqu'au moment des analyses.

L'ensemble des analyses réalisées sur les échantillons de boues est présenté dans le Tableau II-11, ainsi que les objectifs poursuivis. Les techniques de microscopie et de biologie moléculaire mises en œuvre sont décrites dans les paragraphes suivants.

Tableau II-11 : Techniques microbiologiques et observations microscopiques mises en œuvre

Technique d'analyse	Objectif poursuivi
Observation microscopique état frais et coloration (Gram et Neisser)	Suivi de l'abondance et de la diversité des bactéries filamenteuses et de la microfaune Suivi de la morphologie des agrégats biologiques Caractérisation du liquide interstitiel
Hybridation <i>in situ</i> en fluorescence (FISH)	Suivi de la biodiversité des AOB Identification et caractérisation des bactéries filamenteuses d'intérêt
Microscopie électronique à Balayage (MEB)	Caractérisation de la surface des bactéries filamenteuses
MEB couplé à une microanalyse chimique par Energie Dispersive de rayons X (EDX)	Détection et localisation de l'aluminium notamment à la surface des bactéries filamenteuses
Quantification par réaction en chaîne par polymérase (qPCR)	Quantification des populations d'intérêt : bactéries totales, <i>M. parvicella</i> , AOB et PAO
Electrophorèse sur gel en gradient de dénaturants (DGGE)	Suivi de la biodiversité des AOB
Inventaire moléculaire ADNr 16S	Suivi de la biodiversité microbienne dans son ensemble

## II.3. Analyse du fonctionnement du pilote

### II.3.1. Procédure d'analyse des données

La procédure de validation et de consolidation des données recommandées par le groupe de travail IWA « Good Modelling Practice » (2013) a été utilisée pour valider les données de fonctionnement du pilote. Elle est schématisée sur la Figure II-7.

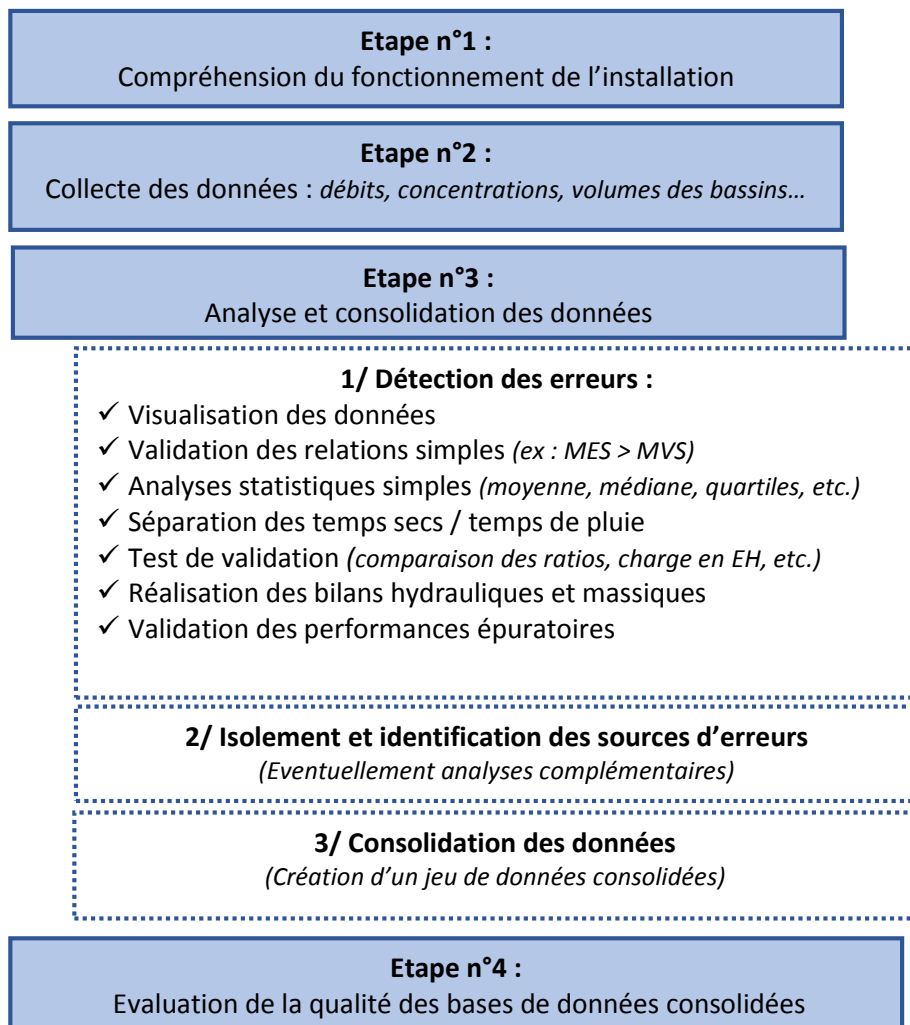


Figure II-7 : Procédure d'analyse des données – adaptée de Rieger et al. (2013)

- Compréhension du fonctionnement du procédé et collecte des données

Une bonne connaissance des flux appliqués et de l'emplacement des diverses unités (bassins, pompes, préleveurs, etc.) de l'installation étudiée est nécessaire pour l'évaluation et la compréhension du jeu de données. Les données utiles sont ensuite collectées et archivées selon leur nature (influent, eau décantée, liqueurs mixtes, boues, effluent) et leur type (concentration, données de dimensionnement, etc.).

- Analyse et consolidation des données

La première étape de validation consiste en une analyse descriptive simple des jeux de données afin de détecter les erreurs potentielles. La visualisation graphique des données permet d'obtenir une vue d'ensemble des variations subies par le procédé. La détection des valeurs potentiellement aberrantes (ou exceptionnelles) est réalisée en évaluant la cohérence des données. Pour cela deux méthodes sont employées. La première, dite pragmatique, consiste à détecter les valeurs aberrantes à l'aide de la définition même des paramètres. Par exemple, en se basant sur des relations logiques et simples telles que  $NTK > NH_4$  ou  $MES > MVS$ . La deuxième méthode consiste à utiliser des analyses statistiques simples qui permettent d'affiner la recherche de valeurs aberrantes en suivant l'évaluation des distributions à l'aide des « boîtes à moustaches » de Tukey. La construction des boîtes à moustache est basée sur les quartiles. Ainsi, la médiane et l'écart interquartile ne sont pas influencés par les valeurs extrêmes. Les frontières basses et hautes sont fixées à 1,5 fois l'écart interquartile ( $Q3-Q1$ ). Les valeurs étant à l'extérieur de ces frontières sont considérées comme erronées.

La différenciation temps sec/temps de pluie permet une analyse plus fine des données notamment pour expliquer certaines variations ou valeurs exceptionnelles. Cette différenciation est réalisée en évaluant la distribution des données de débit entrant (fréquence, quartiles). La comparaison de la valeur moyenne de chaque ratio de l'influent avec ceux caractéristiques des effluents urbains aide à la caractérisation de l'influent, à savoir s'il est atypique ou non, tout comme le calcul de la charge spécifique en équivalents habitants.

La validation avancée des données consiste à identifier les erreurs précédemment détectées en recoupant les différentes analyses. Elle s'effectue à l'aide des bilans hydrauliques et massiques, notamment sur le phosphore. La validation des performances épuratoires, tel que le calcul de l'âge de boues, permet à la fois de caractériser le fonctionnement du pilote et de repérer certaines erreurs. Le recouvrement des bilans est un très bon indicateur de la validité des données. Idéalement, la réconciliation des données doit conduire à boucler les bilans à  $\pm 10\%$ . Les erreurs les plus fréquemment identifiées sont liées à la mesure des débits, au prélèvement des échantillons ou à la méthode d'analyse.

Une fois la source de l'erreur identifiée, les données concernées peuvent être corrigées ou écartées de l'étude selon leur importance pour le reste du projet. Lorsque la consolidation des données s'avère impossible, la collecte de données supplémentaires ou l'émission d'hypothèses sur ces données peut être envisagée afin d'assigner les erreurs dans les jeux de données. Les données erronées ou biaisées peuvent être ainsi recalculées en fonction d'autres données ou des ratios décrits dans la littérature.

- Évaluation de la qualité des bases de données et de la consolidation

L'ensemble des hypothèses émises pour la consolidation des données doit être discuté et approuvé entre autres par les responsables d'exploitation. Ensuite, un jeu de données consolidées est généré et peut être utilisé.

### II.3.2. Bilans hydraulique et massiques

#### II.3.2.1. Bilan hydraulique

En toute logique, il ne peut pas y avoir de perte ou de production sur les débits. Les bilans hydrauliques doivent donc être fermés comme l'indique l'Équation II-6. Une marge d'erreur de 5 % peut être tolérée. Dans l'analyse des données du pilote, le bilan hydraulique a été réalisé sur le système biologique après le décanteur primaire ( $Q_{ED}$ ).

$$Q_{ED} = Q_{Eff} + Q_{B\ ext} + Q_{B\ Rcl}$$

Équation II-6

Avec :

$Q_{ED}$  : débit en sortie du décanteur primaire ( $m^3\ j^{-1}$ ) ;

$Q_{Eff}$  : débit de l'effluent ( $m^3\ j^{-1}$ ) ;

$Q_{B\ ext}$  : débit d'extraction des boues ( $m^3\ j^{-1}$ ) ;

$Q_{B\ rcl}$  : volume de boues raclées en surface du clarificateur ( $m^3\ j^{-1}$ ).

Les débits ont été mesurés avec des débitmètres excepté pour les débits d'extraction des boues biologiques et le raclage des flottants. Les volumes d'extraction ont été recalculés en fonction de la durée d'ouverture de la vanne pneumatique de la pompe d'extraction des boues du décanteur secondaire. Les flottants raclés ont été récupérés dans une cuve annexe dont le volume a été mesuré quotidiennement.

#### II.3.2.2. Bilans massiques

L'ensemble des bilans massiques est réalisé en suivant le principe simple de la conservation de la matière. Le bilan global sur un paramètre X est décrit selon l'Équation II-7.

$$V \frac{dX}{dt} = \Phi X_{entrée} + \Phi X_{sortie} \pm r$$

Équation II-7

Avec :

$\frac{dX}{dt}$  : accumulation de X dans le procédé ;

$\Phi X_{entrée} = \sum \frac{[X]_{entrée} \times Q_{entrée}}{1000}$  : somme des flux entrants du paramètre X ;

$\Phi X_{sortie} = \sum \frac{[X]_{sortie} \times Q_{sortie}}{1000}$  : somme des flux sortants du paramètre X ;

$r$  : production ou consommation de X au cours du traitement.

### II.3.3. Charge massique, âge de boues et performance épuratoire

La charge massique appliquée au pilote correspond au rapport de la quantité de la pollution carbonée (DBO<sub>5</sub>) reçue par la quantité de biomasse (MVS) présente dans le système. Elle peut être calculée comme suit :

$$Cm = \frac{Q_{ED} \times [DBO_5]_{ED}}{MVS_{Système} \times 1000}$$

Équation II-8

Avec :

**C<sub>m</sub>** : charge massique (kg DBO<sub>5</sub> (kg MVS)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>) ;

**[DBO<sub>5</sub>]<sub>ED</sub>** : concentration en DBO<sub>5</sub> de l'eau décantée ;

**MVS<sub>système</sub>** : masse totale des MVS dans le système (kg MVS).

L'âge de boues en jours est déterminé sur les périodes d'intérêt, en calculant le ratio de la masse de boues moyenne dans le système sur la masse de boues extraite quotidiennement.

Les performances épuratoires du pilote pour les paramètres d'intérêt sont déterminées suivant l'Équation II-9 :

$$Rendement (\%) = 1 - \frac{[X]_{Eff}}{[X]_{Inf}}$$

Équation II-9

Avec [X]<sub>eff</sub> et [X]<sub>inf</sub> respectivement la concentration du paramètre X dans l'effluent et l'influent.

### II.3.1. Quantité maximale de phosphore à précipiter par voie physico-chimique

La quantité journalière maximale de phosphates à précipiter par voie physico-chimique peut être estimée comme suit :

$$\Phi P_{\text{à précipiter}} = \Phi P_{\text{entrée_soluble}} - \Phi P_{\text{assimilé}} - \Phi P_{\text{sorti_soluble}}$$

Équation II-10

Avec :

**ΦP<sub>à précipiter</sub>** : le flux de phosphates à précipiter (mol j<sup>-1</sup>);

**ΦP<sub>entrée\_soluble</sub>** : le flux de phosphates entrant (mol j<sup>-1</sup>);

**ΦP<sub>sortie\_soluble</sub>** : le flux de phosphates sortant (mol j<sup>-1</sup>), calculé à partir d'une concentration en sortie respectant la limite tolérée de 1 mg L<sup>-1</sup> ;

**ΦP<sub>assimilé</sub>** : le flux de phosphates assimilé par la biomasse épuratrice pour les besoins métaboliques, correspondant à 1 % de la DBO<sub>5</sub> éliminée (mol j<sup>-1</sup>).

## II.4. Modélisation dynamique du fonctionnement du pilote

Étant donné les réactions ayant lieu dans le pilote (déphosphatation biologique et physico-chimique), le modèle ASM3+BioP (Rieger *et al.* 2001) a été retenu. Ce modèle comprend 25 processus dont 1 pour l'hydrolyse du substrat lentement biodégradable et 11 décrivant les processus biologiques relatifs aux organismes hétérotrophes et autotrophes. Ces processus sont décrits dans le Tableau II-12. Le Tableau II-13 décrit les 11 autres processus relatifs à la déphosphatation biologique et les 2 processus associés à la déphosphatation physico-chimique. La matrice de Gujer du modèle, avec la stœchiométrie et les cinétiques des processus biologiques, est donnée en Annexe 2. Les simulations ont été réalisées à l'aide du logiciel SIMBA# (version 1\_0\_102).

**Tableau II-12 : Description des processus biologiques relatifs aux organismes hétérotrophes et autotrophes**

Processus		Description
p1	Hydrolyse du substrat lentement biodégradable	Transformation du substrat lentement biodégradable ( $X_S$ ) en substrat facilement biodégradable ( $S_S$ )
Organismes hétérotrophes		
p2	Stockage aérobie	Transformation du substrat lentement biodégradable en réserves intracellulaires ( $X_{STO}$ ) en conditions aérobies et anoxiques
p3	Stockage anoxie	
p4	Croissance aérobie des hétérotrophes	Croissance des bactéries hétérotrophes sur $X_{STO}$ en conditions aérobies et anoxiques en tenant compte des besoins en azote ( $S_{NH}$ ) et en phosphore ( $S_{PO4}$ ). L'hydrolyse des réserves intracellulaires suit un modèle de Comtois. La croissance des hétérotrophes directement sur le substrat facilement biodégradable n'est pas prise en compte, simplifiant ainsi le modèle
p5	Croissance anoxique des hétérotrophes	
p6	Respiration endogène aérobie sur la biomasse	Diminution de la biomasse active par auto-oxydation conduisant à la libération de produits inertes
p7	Respiration endogène anoxie sur la biomasse	
p8	Respiration endogène aérobie sur les produits de stockage	Utilisation des composés de stockage pour les besoins endogènes des hétérotrophes en conditions aérobies et anoxiques. Il n'y a pas de production d'inerte
p9	Respiration endogène anoxie sur les produits de stockage	
Organismes autotrophes		
p10	Croissance des autotrophes	Croissance des bactéries autotrophes sur l'azote ammoniacal
p11	Respiration endogène aérobie	Diminution de la biomasse active par auto-oxydation conduisant à la libération de produits inertes
p12	Respiration endogène anoxique	Utilisation des composés de stockage pour les besoins endogènes des autotrophes

Tableau II-13 : Description des processus relatifs à la déphosphatation biologique et physico-chimique

Processus		Description
<b>PAO</b>		
pp1	Stockage du PHA	Transformation du substrat facilement biodégradable en produits de réserve sous la forme de PHA ( $X_{PHA}$ ). Le stockage est directement lié à l'énergie libérée lors du relargage du phosphore ( $X_{PP}$ ). Ce processus peut avoir lieu quelles que soient les conditions d'aération. L'influence de l'oxygène est seulement modélisée par la compétition entre les PAO et les autres hétérotrophes.
pp2	Stockage aérobic du PP	Stockage des polyphosphates ( $X_{PP}$ ). La respiration aérobic ou anoxique sur $X_{PHA}$ fournit l'énergie nécessaire à ce processus. Un terme d'inhibition est implémenté afin de simuler une capacité maximale de stockage du phosphore. En conditions anoxiques, un facteur de réduction est introduit afin de tenir compte du fait que toutes les PAO ne peuvent pas stocker dans ces conditions.
pp3	Stockage anoxique du PP	
pp4	Croissance aérobic des PAO	Croissance des PAO sur $X_{PHA}$ . Comme pour le processus pp3, un facteur de réduction est introduit en conditions anoxiques.
pp5	Croissance anoxique des PAO	
pp6	Respiration endogène aérobic	Diminution des PAO actifs par auto-oxydation conduisant à la libération de produits inertes. Un facteur de réduction est introduit en condition anoxiques.
pp7	Respiration endogène anoxique	
pp8	Lyse aérobic des réserves $X_{PP}$	Processus analogues à la respiration endogène de la biomasse sur les produits de stockage (p8 et p9). En conditions anoxiques des facteurs de réduction sont introduits.
pp9	Lyse anoxique des réserves $X_{PP}$	
pp10	Lyse aérobic des réserves $X_{PHA}$	
pp11	Lyse anoxique des réserves $X_{PHA}$	
<b>Précipitation physico-chimique</b>		
pp12	Précipitation du phosphore	Il est supposé dans ces processus que $X_{MeOH} \rightarrow Me(OH)_3$ et que $X_{MeP} \rightarrow MePO_4$ , et qu'il existe un équilibre entre la forme précipitée et hydrolysée.
pp13	Redissolution du précipité	

### II.4.1. Calage et validation des données

Après la consolidation des données et le choix du modèle, des simulations ont été réalisées à l'aide du logiciel SIMBA afin de vérifier la cohérence des prédictions par rapport aux données de fonctionnement de l'installation. Certains paramètres du modèle ont dû alors être ajustés. Les recommandations du groupe de travail IWA « Good Modelling Practice » (Rieger *et al.* 2013) ont été suivies et adaptées aux objectifs du projet. Les différentes étapes du processus de calage avec les critères ayant servi de référence et les erreurs tolérées, entre les prédictions et les données réconciliées, sont schématisées sur la Figure II-8.

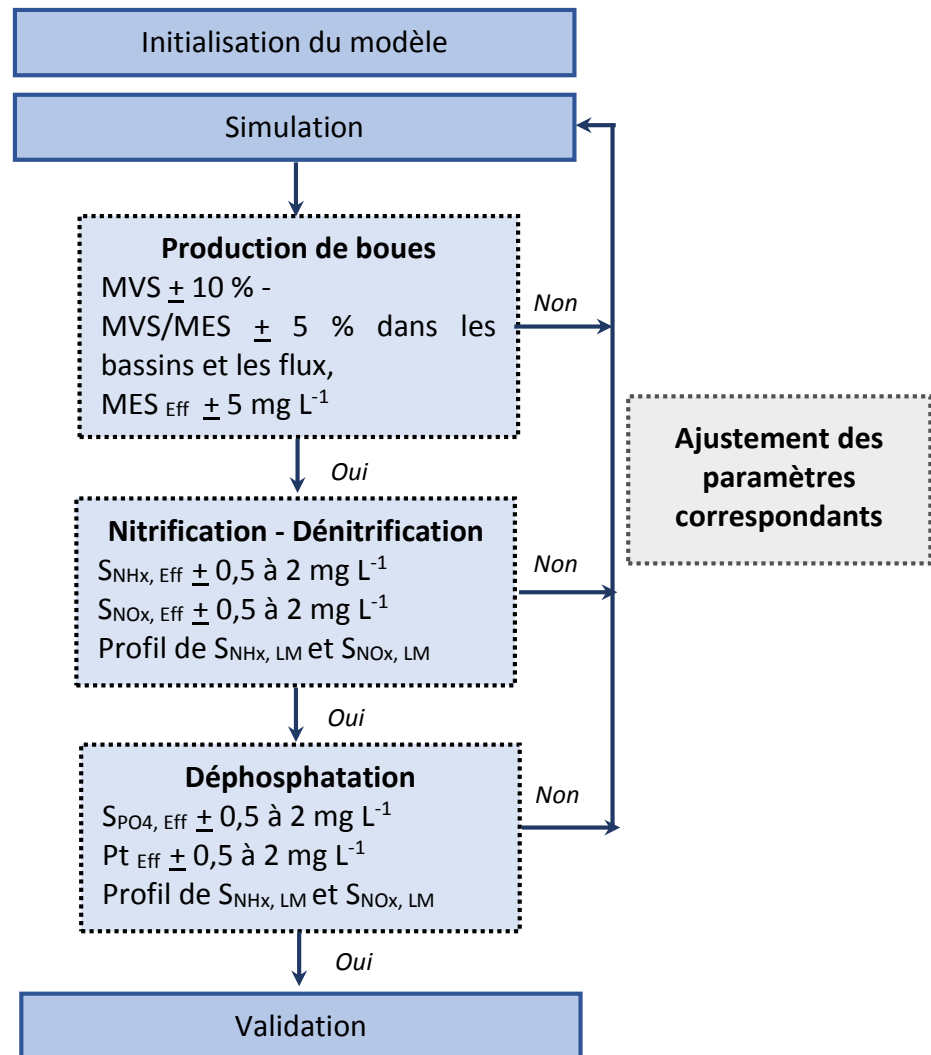


Figure II-8 : Etapes de calibration du modèle - adaptées de Rieger *et al.* (2013)

Avant de réaliser les premières simulations en régime dynamique, il est nécessaire de définir le schéma de l'installation et d'initialiser le modèle à partir d'un jeu de données. A partir des moyennes de ce jeu de données, le fractionnement de l'influent, les conditions de décantation du clarificateur et dans certains cas la structure du modèle peuvent être ajustés. Pour le calage du modèle, les simulations ont été réalisées en régime dynamique et les paramètres permettant d'obtenir les objectifs décrits en Figure II-8 ont été ajustés, si cela était nécessaire, puis validés successivement.



## II.5. Observations microscopiques

### II.5.1. Microscopie classique

Des observations microscopiques ont été réalisées pour chaque prélèvement afin de suivre l'abondance et la diversité des bactéries filamenteuses, de la microfaune ainsi que la morphologie des agrégats biologiques. Elles ont été réalisées avec un microscope droit à contraste de phase (Imager A 2 AX10, Zeiss pour le suivi  $\text{AlCl}_3$  et Laborlux D, Leica pour le suivi  $\text{Al-Fe-Cl}_3$ ). Les images ont été acquises avec le logiciel Zen lite 2011 (Zeiss) pour le suivi  $\text{AlCl}_3$ .

Les observations à l'état frais sont réalisées en contraste de phase. Ces observations permettent de caractériser la microfaune (biodiversité, état physiologique), les agrégats biologiques (taille, structure, morphologie), l'état du liquide interstitiel (filaments libres, bactéries dispersées). L'identification des bactéries filamenteuses en microscopie, à l'état frais et après colorations de Gram et de Neisser, est basée sur l'étude des caractéristiques du filament, telles que la présence de ramifications, la mobilité, la localisation, la forme du filament et des cellules (Eikelboom *et al.* 1998; Jenkins *et al.* 2004). Leur abondance peut être estimée en attribuant un indice filamenteux (IF) global ou spécifique à chaque espèce (Jenkins *et al.* 2004). Cet indice est attribué de façon subjective selon l'abondance des filaments dans les flocs suivant une échelle allant de 0 à 6, décrite dans le Tableau II-14.

Tableau II-14 : Indices Filamenteux (IF)

IF	Correspondance en nombre de filaments par agrégat biologique
0 Absence	Pas de filament
1 Peu de filaments	Filaments présents occasionnellement dans certains agrégats
2 Quelques filaments	Filaments présents fréquemment dans certains agrégats
3 Fréquents	Filaments présents dans tous les agrégats à faible densité (1 à 5 / agrégat)
4 Très fréquents	Filaments présents dans tous les agrégats à moyenne densité (5 à 20 / agrégat)
5 Abondant	Filaments présents dans tous les agrégats à forte densité (> 20 / agrégat)
6 En excès	Filaments présents dans tous les agrégats (filaments > agrégats)

Pour les colorations, 10  $\mu\text{L}$  d'échantillon sont déposés sur une lame à puits. Le protocole détaillé des colorations est donné dans le Tableau II-15. Les lames sont ensuite observées en lumière directe.

Tableau II-15 : Protocole des colorations de Gram et de Neisser

Coloration de Neisser		Coloration de Gram	
Bleu de méthylène (2v)	15 s	Cristal violet	1 min
Cristal violet (1v)			
Rinçage à l'eau distillée		Rinçage à l'eau distillée	
Chrysoïdine	45 s	Lugol	1 min
		Rinçage à l'eau distillée puis à l'alcool	
Rinçage à l'eau distillée		Safranine	1 min
		Rinçage à l'eau distillée	

### II.5.2. L'hybridation *in situ* de sondes fluorescentes (FISH)

La technique d'hybridation de sonde fluorescente *in situ* a été retenue afin d'étudier la biodiversité des AOB ainsi que la répartition spatiale des bactéries filamenteuses d'intérêt. Le principe repose sur l'hybridation *in situ* de sondes oligonucléotidiques marquées d'un fluorophore (FITC, Cy3, Cy5). Les sondes s'hybrident à des séquences spécifiques des ARN ribosomiques 16S des cellules cibles. Il est ainsi possible de localiser au sein d'une matrice complexe différentes espèces ou groupes d'intérêt par visualisation microscopique.

#### II.5.2.1. Sondes

Chaque sonde est définie par une séquence nucléotidique spécifique à une espèce ou à un ensemble bactérien d'intérêt. L'ensemble des sondes utilisées pour cette étude (MWG Eurofins) est synthétisé dans le Tableau II-16.

Il n'existe pas de sonde spécifique aux bactéries filamenteuses Type 0041/0675. Le plus souvent, ce morphotype est étudié en ciblant le phylum *Chloroflexi* ou la sous-division TM7 (Hugenholtz *et al.* 2001; Bjornsson *et al.* 2002; Nielsen *et al.* 2009). Des tests préliminaires ont mis en évidence que les morphotypes présents dans la boue étudiée répondaient mieux aux sondes ciblant le phylum *Chloroflexi* que la division TM7 et qu'il était préférable de procéder à une fixation au paraformaldéhyde.

#### II.5.2.2. Protocole

Le protocole utilisé est celui décrit par Amann *et al.* (1995). Il se décompose en différentes étapes qui comprennent la fixation de l'échantillon, sa déshydratation puis l'hybridation des sondes oligonucléotidiques avant une étape de rinçage (Annexe 3). Le protocole est complété par une perméabilisation préalable des parois, notamment pour l'hybridation des sondes MPAmix suivant le protocole de Kragelund *et al.* (2007). La lame est ensuite préparée pour être visualisée au microscope confocal à balayage laser (CLSM - Zeiss Axiovert 200M LSM 510 META) piloté par le logiciel Zen 2007 Light Edition de Zeiss.

**Tableau II-16 : Sondes oligonucléotidiques – marquage FISH**  
FA : formamide

Cible	Sonde	Séquence	% FA	Fluorophore	Référence
<i>Microthrix</i> morphotype (MPAmix)	MPA223	GCC GCG AGA CCC TCC TAG	20	Cy3	(Erhart <i>et al.</i> 1997)
	MPA60	GGA TGG CCG CGT TCG ACT			
	MPA645	CCG GAC TCT AGT CAG AGC			
Ensemble des bactéries (EUB mix)	EUB 338 I	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	--	FITC ou Cy5	(Daims <i>et al.</i> 1999)
	EUB 338 II	GCA GCC ACC CGT AGG TGT			
	EUB 338 III	GCT GCC ACC CGT AGG TGT			
<i>phylum Chloroflexi</i> (CFXmix)	CFX 1223	CCA TTG TAG CGT GTG TGT MG	35	Cy5	(Bjornsson <i>et al.</i> 2002)
	GNSB941	AAA CCA CAC GCT CCG CT	35	Cy5	(Gich <i>et al.</i> 2001)

### II.5.3. Microscopie électronique à balayage

La microscopie électronique à balayage (MEB) a été retenue afin d'étudier la surface des bactéries filamenteuses en présence de sels métalliques. L'objectif était également de repérer les dépôts alumineux à la surface des éléments. Pour cela, deux types d'observations ont été effectués. Une première étude des structures a été réalisée sur la plateforme d'imagerie MIMA2 du centre de recherche de l'INRA (Micalis, B2HM, Massy, 91). Des micro-analyses chimiques du type EDX (spectroscopie dispersive en énergie des rayons X) ont ensuite été réalisées sur la plateforme MEB-FIB de l'Institut de Minéralogie, de Physique des Matériaux et de Cosmochimie (IMPMC - Université Pierre et Marie Curie). Le principe de la technique est décrit dans l'Annexe 4.

#### II.5.3.1. Conditionnement des échantillons

##### II.5.3.1.1. Fixation des échantillons

Un échantillon de 2 mL de boues activées est centrifugé à 3 000 g pendant 5 min à température ambiante. Le surnageant est délicatement éliminé puis le culot est lavé avec 1 mL d'une solution tampon filtrée (PBS 1X) et re-centrifugé. Le culot est repris dans 1 mL de solution de glutaraldéhyde 2,5 % tamponnée avec une solution de cacodylate de sodium ( $C_2H_6AsNaO_2$ , 0,2 M, pH 7,4) et stocké à 4°C.

##### II.5.3.1.2. Préparation des échantillons pour les observations en MEB

Pour une adhésion optimale, l'intégralité de l'échantillon fixé est versée délicatement sur un support en aluminium préalablement déposé au fond d'une plaque à puits. La plaque est mise à reposer au minimum 1 à 2 heures à température ambiante avant d'être stockée à plat à 4°C. La solution de fixation est remplacée par le tampon de cacodylate de sodium utilisé au préalable par lavages successifs. La préparation est ensuite progressivement déshydratée par une solution d'éthanol absolu avant d'être complètement déshydratée par contournement du point critique (Emitech K850, UK), ce qui permet de préserver la structure des échantillons. L'échantillon est ensuite métallisé avec un mélange d'or et de palladium afin de le rendre conducteur (Polaron SC7640, UK).

##### II.5.3.1.3. Préparation des échantillons pour les analyses MEB-EDX

L'analyse EDX permet de localiser et de caractériser de possibles zones enrichies en sels d'aluminium dans les boues. Les échantillons précédemment analysés en MEB n'ont pu être réutilisés car le support ayant servi au dépôt et les plots sur lesquels ils avaient été fixés étaient en aluminium. De nouveaux échantillons ont donc été préparés selon le protocole suivant, limitant toute contamination alumineuse.

Un volume de 100  $\mu$ L d'échantillon fixé est dilué dans 900  $\mu$ L d'eau MilliQ. Le mélange est filtré sur des membranes Isopore en polycarbonate (Millipore - seuil 0,2  $\mu$ L –  $\varnothing$  25 mm). Les filtres sont ensuite séchés à l'étuve ou à l'air libre puis fixés sur une lame en verre d'épaisseur suffisante pour que le bombardement électronique n'atteigne pas le socle, qui est par défaut en aluminium.

L'ensemble est ensuite métallisé (EM SCD 500, Leica) puis analysé avec le microscope Field Emission Gun Scanning Electron Microscope (GEMINI ZEISS Ultra55) opérant à 15 kV.

### **II.5.3.2. Analyse EDX**

Afin d'avoir une approche statistique sur la biosorption préférentielle ou non de l'aluminium sur certaines bactéries filamenteuses, une zone de l'échantillon filtré a été cartographiée avec 120 acquisitions. Différents éléments chimiques ont été caractérisés par analyse dispersive en énergie des rayons X (analyseur EDX : EDS QUANTAX avec Xflash Detector 4010, Brüker) : l'oxygène, le carbone, l'aluminium, le phosphore, le calcium, le potassium et l'azote. L'intensité du signal donne une information semi-quantitative sur l'accumulation de l'élément analysé en un point. L'analyse étant également réalisée sur la profondeur de l'échantillon, l'intensité du signal est impactée par l'épaisseur des objets analysés, dans le cas de cette étude, les agrégats biologiques et les bactéries. L'oxygène étant présent dans l'ensemble des objets, l'analyse EDX de l'oxygène sert de référence à l'interprétation des différents signaux.

## **II.6. Techniques de biologie moléculaire**

### **II.6.1. Extraction de l'ADN génomique**

Le choix du protocole d'extraction de l'ADN génomique est très important car l'abondance et la biodiversité des bactéries lysées peut varier selon le kit utilisé (de Liphay *et al.* 2004). D'après Guo et Zhang (2013) et Vishnivetskaya *et al.* (2014), le kit commercial PowerSoil® de MoBio est le deuxième kit commercial ayant obtenu les meilleurs résultats en terme de qualité et de rendement d'extraction ( $16 \% \pm 8 \%$ ) bien que les quantités d'ADN extrait restent faibles. Un inconvénient répertorié de ce kit est la variabilité des quantités d'ADN extrait par rapport à d'autres kits. Les extractions ont donc été réalisées en triplicats afin de pallier le manque de reproductibilité (cf. paragraphe IV.3.1).

La concentration en ADN et sa qualité ont été mesurées par spectrophotométrie (Biowave II, Biochrom). Le rapport de l'absorbance à 260 nm et de l'absorbance à 280 nm de l'ADN extrait doit être dans l'idéal compris entre 1,8 et 2. Si le rapport est inférieur à 1,8, ceci indique que la solution est contaminée par des protéines. Si le rapport est supérieur à 2, ceci indique que la solution est contaminée par de l'ARN.

L'intégrité de l'ADN extrait a été contrôlée sur gel d'agarose en utilisant le BET pour visualiser l'ADN sous UV. Le marqueur de taille de 1 à 10 kb (Sigma) a été utilisé comme référence.

### **II.6.2. Suivi de populations par PCR quantitative**

La technique de quantification par réaction en chaîne par polymérase (qPCR) a été retenue afin de suivre l'évolution des quantités de biomasse au cours des différents essais. Les populations d'intérêt sont les bactéries totales, les PAO (Polyphosphate Accumulating Organisms), les AOB (Ammonia Oxidizing Bacteria) et *M. parvicella*. Le principe de la technique est décrit dans l'Annexe 5.

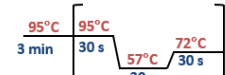
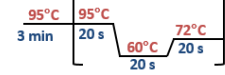
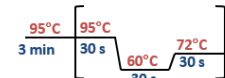
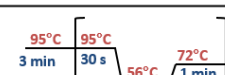
### II.6.2.1. Protocole

La vérification *in silico* de la spécificité de ces amorces a été réalisée au préalable avec l'outil BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) du National Center for Biotechnology Information (NCBI) ainsi qu'avec l'outil TestPrimer de SILVA (Klindworth *et al.* 2013).

Le couple d'amorces retenu pour le suivi des bactéries totales est le couple 341F-534R. Il cible une séquence de la région V3 de l'ADNr 16S (Muyzer *et al.* 1993) et concerne au moins 77 % des bactéries de la base de donnée Silva. Les séquences décrites par Crocetti *et al.* (2000) sont, d'après la littérature, les plus adaptées à l'étude des PAO du genre *Accumulibacter* (Fukushima *et al.* 2007; Seviour and McIlroy 2008). Le suivi de *M. parvicella* a été réalisé avec les seules amorces décrites dans la littérature qui ciblent une séquence de l'ADNr 16S (Kaetzke *et al.* 2005). Le suivi des  $\beta$ -AOB a été réalisé grâce aux amorces ciblant le gène de fonction amoA (Rotthauwe *et al.* 1997).

Les amorces utilisées sont décrites dans le Tableau II-17 ainsi que les conditions de réaction.

**Tableau II-17 : Description des amorces et des conditions de qPCR**

Cible	Séquence 5'-3' (amorces F et R)		Cible	Taille de l'amplicon	Concentration amorce	Conditions de PCR	
Référence							
Bactéries (Muyzer et al., 1993)	341F	CCT ACG GGA GGC AGC AG (17)	ADNr	194 bp	0,5 μM		X 40 cycles
	534R	ATT ACC GCG GCT GCT GG (17)	16S				
M. parvicella (Kaetzke et al., 2005)	Mp0828S	GGT GTG GGG AGA ACT CAA CTC (21)	ADNr	210 pb	0,4 μM		X 35 cycles
	Mp1018A	GAC CCC GAA GGA CAC CG (17)	16S				
PAO (Fukushima et al., 2007)	PAO651f	CTG GAG TTT GGC AGA GGG (18)	ADNr	217 pb	0,4 μM		X 40 cycles
	PAO846r	GTT AGC TAC GGC ACT AAA AGG (21)	16S				
β-AOB (Rotthauwe et al., 1997)	amoA-1F	GGG GTT TCT ACT GGT GGT (18)	Gène de fonction amoA	491 pb	0,4 μM		X 45 cycles
	amoA-2R	CCC CTC KGS AAA GCC TTC TTC (21) Avec K -> G ou T et S -> 5 G ou C					

Les analyses ont été réalisées avec le thermocycleur CFX 96 Real Time System (Biorad) et le logiciel d'analyse associé CFX Manager. Le mélange réactionnel de 25  $\mu$ L se constitue de 2  $\mu$ L de solution d'ADN à 5 ng  $\mu$ L<sup>-1</sup>, de 12,5  $\mu$ L de iQ SYBR Green Supermix 2X (Biorad), d'un volume variable en amorces (Tableau II-17), le volume est complété avec de l'eau MilliQ. Chaque protocole d'amplification a été optimisé et ajusté au matériel du laboratoire (réalisation d'un gradient de températures d'hybridation et de concentrations en amorces).

### II.6.2.2. Construction de la gamme standard

Pour chaque gène cible, un plasmide pEX-A (2 450 bp) a été défini avec un insert correspondant à la séquence d'ADN d'intérêt et un site unique de coupure par l'enzyme Hind III (Eurofins MWG). La taille de l'amplicon inséré est donnée dans le Tableau II-17. Le plasmide est commercialisé sous forme super-enroulée, ce qui peut engendrer une surestimation du nombre de copies. Il est donc recommandé de procéder à une linéarisation du plasmide (Hou *et al.* 2010). La linéarisation du plasmide est réalisée par digestion enzymatique à partir de 5  $\mu$ L d'ADN plasmidique à 200

ng/μL, 3 μL de tampon enzymatique 10X, 21,2 μL d'H<sub>2</sub>O et de 0,5 μL d'enzyme Hind III (10 U/μL, Promega.) Le mélange est incubé 2 h à 37°C puis l'enzyme est inactivée 20 min à 80°C. Le nombre de copies par microlitre du plasmide est calculé à partir de la concentration d'ADN mesurée au spectrophotomètre (Biowave II) d'après l'Équation II-11.

$$[Copies] = \frac{N \times [ADN]}{T \times M_{pb}}$$

Équation II-11

Avec :

**[Copies]** : concentration en nombre de copies du plasmide par μL ;

**N** : nombre d'Avogadro (6,023 10<sup>23</sup> mol<sup>-1</sup>) ;

**[ADN]** : concentration en plasmide après linéarisation (ng μL<sup>-1</sup>) ;

**T** : taille du plasmide contenant l'insert (pb) ;

**M<sub>pb</sub>** : masse molaire moyenne d'une paire de bases (660 g mol<sup>-1</sup>).

Des dilutions en cascade sont ensuite réalisées afin d'obtenir une gamme allant de 10<sup>8</sup> à 10<sup>2</sup> copies μL<sup>-1</sup>. Les gammes ont été réalisées en triplicats pour chaque plaque.

### II.6.3. Étude de la biodiversité par électrophorèse en gradient de gel dénaturant (DGGE)

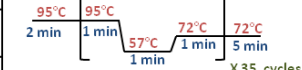
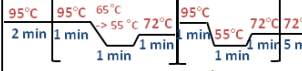
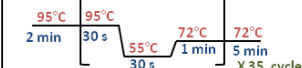
La DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) a été retenue afin d'étudier l'évolution de la biodiversité des AOB au cours des différents essais. Le principe est détaillé dans l'Annexe 6.

#### II.6.3.1. Conditions de PCR

L'analyse des AOB nécessite de réaliser une PCR nichée, qui associe deux réactions successives de PCR. La première réaction cible de façon spécifique l'ensemble de la biomasse nitrosante (Kowalchuk *et al.* 1997). La seconde réaction amplifie une partie de la séquence obtenue lors de la première réaction afin d'augmenter le nombre d'amplicons, des amorces ciblant l'ensemble des bactéries sont utilisées (Muyzer *et al.* 1993). Durant les 20 premiers cycles de la seconde PCR, la diminution progressive de la température d'hybridation à chaque cycle (« touchdown ») permet d'augmenter le nombre de séquences amplifiées tout en évitant des amplifications non spécifiques.

Le mélange réactionnel de 25 μL est constitué de 5 μL de tampon de réaction 5X (GoTaq® Flexi Buffer, Promega), 2 μL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM, Promega), 0,5 μL de dNTPs (10 mM, Promega), d'un volume variable en amorces (Tableau II-18), de 0,125 μL de Taq polymérase (GoTaq® Hot Start, Promega), de 2,5 μL d'ADN. Le mélange réactionnel est ensuite complété par de l'eau MiliQ. Les amorces et les conditions de PCR sont décrites dans le Tableau II-18.

Tableau II-18 : Description des amorces et des conditions de PCR

Cible	Séquence 5'-3' (amorce F et R)		Cible	Taille de la	Concentration	Conditions de PCR
Référence				séquence cible	amorce	
AOB <i>(Kowalchuk et al. 1997)</i>	CTO 189 F AB	GGA GRA AAG CAG GGG ATG G Avec R -> G ou A	ADNr 16S	465 pb	0,32 µM	
	CTO 189 FC	GGA GGA AAG TAG GGG ATC G			0,16 µM	
	CTO 654 R	CTA GCY TTG TAG TTT CAA ACG C Avec Y -> T ou C			0,48 µM	
Bactéries <i>(Muyzer et al., 1993)</i>	341 F-GC	CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG	ADNr 16S	194 pb	0,5 µM	
	534-R	ATT ACC GCG GCT GCT GG				
	341 F	CCT ACG GGA GGC AGC AG	ADNr 16S	194 pb	0,5 µM	
	534-R	ATT ACC GCG GCT GCT GG				

### II.6.3.2. Conditions d'électrophorèse

Les analyses ont été réalisées avec le système INGENY PhorU (Ingeny). Le gradient de dénaturant appliqué pour les AOB est de 35-60 % d'urée et de formamide. La description du système INGENY PhorU et la composition des solutions mères servant à la réalisation du gradient sont précisées dans l'Annexe 6. Une fois le gel coulé et après 1h30 de polymérisation, un gel non dénaturant est ajouté sur quelques centimètres en haut du gel. Le peigne est inséré afin de former les puits où seront déposés les échantillons. Après polymérisation, la cassette est immergée dans du tampon TAE 1X. La migration est réalisée pendant 16 h sous une tension continue de 120 V à 60°C. Afin de révéler les bandes, 15 ml de SYBR® Gold 1X (Invitrogen) sont déposés sur le gel, recouvert par un film plastique pendant 30 minutes à l'obscurité. La visualisation des bandes est réalisée par l'intermédiaire d'un transilluminateur UV (Biorad Geldoc XR) et l'acquisition d'images à l'aide du logiciel Quantity One (Biorad).

Les profils ont été ensuite comparés à l'aide du logiciel GelCompar et un dendrogramme a été généré par comparaison de bandes de même niveau suivant le coefficient de corrélation binaire DICE et l'algorithme UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic average).

### II.6.3.3. Excision des bandes et séquençage de l'ADN correspondant

Pour identifier les espèces correspondant aux bandes observées, il est nécessaire d'isoler des fragments d'ADN et de les séquencer. Pour cela les bandes d'intérêt sont découpées puis immergées dans 50 µL d'eau MiliQ trois jours à 4°C. L'ADN extrait est ensuite ré-amplifié par PCR à partir de 5 µL d'échantillon, avec les amorces 341F/534R non clampées. Le mélange réactionnel de 50 µL se constitue de 10 µL de tampon de réaction 5X (GoTaq® Flexi Buffer, Promega), 4 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM, Promega), 1 µL de dNTPs (10 mM, Promega), d'un volume variable en amorces (Tableau II-18) et de 0,25 µL de Taq polymérase (GoTaq® Hot Start, Promega). Le mélange est ensuite complété par de l'eau MiliQ. Les amorces et les conditions de PCR sont décrites dans le Tableau II-18.

Un volume de 30 µL de produits de PCR a été envoyé pour séquençage (MWG Eurofins Operon) avec une concentration minimale requise de 4 ng µL<sup>-1</sup> pour des séquences de 150 à 300 pb. Les



séquences obtenues ont été comparées à la base de données refseq\_genomic du NCBI en utilisant l'outil BLAST.

#### II.6.4. Inventaire moléculaire

L'inventaire moléculaire, appelé « barcoding moléculaire » ou « code barre génétique », est une technique de taxonomie moléculaire permettant la caractérisation génétique d'un individu ou d'un échantillon d'individus à partir d'un gène du génome. C'est actuellement une des techniques les plus rapides et les plus précises pour l'évaluation environnementale de la biodiversité d'un système écologique riche en espèces inconnues ou difficiles à déterminer.

Cette technique a été utilisée afin d'étudier l'impact de l'aluminium sur la biodiversité de la biomasse des boues activées. L'analyse a été réalisée sur la région V3 et V4 de l'ADNr 16S par la plateforme GeT-PLaGe de l'UMR 1289 TANDEM de l'INRA de Toulouse. Pour les besoins de l'analyse, l'ADN des échantillons d'intérêt a été re-extrait et élué dans un volume de 50 µl au lieu de 100 µl afin de les concentrer. La méthode de séquençage utilisée est basée sur la technologie de l'Illumina Miseq et permet de générer 50 000 séquences d'une longueur de 500 pb en moyenne par échantillon. Le principe simplifié du séquençage selon cette technologie est représenté dans l'Annexe 7.

Après obtention des séquences, un traitement bio-informatique et statistique doit être mené sur les données collectées. Dans un premier temps, un tri des données est réalisé avec le logiciel Mothur (Schloss *et al.* 2009). Pour cela, une analyse de la qualité des séquences est réalisée. En effet, un score de qualité est attribué par défaut à chaque base au moment du séquençage. Pour éliminer les portions de séquence de qualité non satisfaisante, une valeur moyenne de ce score de qualité est calculée sur une fenêtre de 50 pb, toute fenêtre de qualité moyenne inférieure à 25 est supprimée. Cette démarche est réalisée en partant de la fin de la séquence jusqu'à atteindre une fenêtre de qualité suffisante. Les homopolymères d'une longueur supérieure à 6 pb, les bases partiellement caractérisées dites ambiguës et les séquences ayant une longueur inférieure à 250 pb ou supérieure à 600 pb sont supprimées.

Les séquences sont ensuite importées dans Qiime (Caporaso *et al.* 2010) pour réaliser le reste du traitement bio-informatique. Elles sont dans un premier temps alignées en utilisant le programme PyNAST (Caporaso *et al.* 2010) et l'alignement de référence de Silva 108 (<http://www.arb-silva.de/download/archive/qiime/>) (Quast *et al.* 2013). Les chimères, séquences correspondant à des artéfacts d'amplifications, sont ensuite repérées en utilisant le programme ChimeraSlayer (Haas *et al.* 2011) pour être supprimées.

Les séquences ayant 97 % d'identité sont regroupées en sous-groupes appelées OTU (Operational Taxonomic Units) avec le programme UCLUST (Edgar 2010). La séquence la plus longue de chaque OTU est sélectionnée comme séquence représentative de celui-ci. Le critère de la longueur a été choisi plutôt que celui de l'abondance afin d'obtenir une meilleure identification des espèces correspondantes. L'assignement taxonomique est réalisé à l'aide du programme RDP classifier (Ribosomal Database Project) (Wang *et al.* 2007; Cole *et al.* 2009) et de la base de données compatible de Silva 108 en prenant comme indicateur statistique (bootstrap) 0,8. Les séquences identifiées comme correspondant à des eucaryotes ou à des archées sont supprimées car associées à des artéfacts d'amplification.



L'abondance pour chaque OTU est ensuite calculée et les courbes de raréfaction sont générées. Ces courbes permettent d'obtenir une estimation de la couverture en espèces présentes dans l'échantillon analysé. Elles sont matérialisées par des courbes indiquant l'augmentation du nombre d'organismes appartenant à un groupe taxonomique donné en fonction du nombre d'organismes échantillonnés. L'indice de diversité (quantification de l'hétérogénéité de la biodiversité étudiée, indice de Simpson) (Simpson 1949) et l'estimation de la richesse spécifique en espèces par le Chao1 (Chao 1987) sont également générés pour chaque échantillon. L'indice de Shannon permet d'avoir une information à la fois sur la richesse et sur l'hétérogénéité de la population étudiée (Shannon 1948).

Ces différentes étapes du traitement des séquences après inventaire sont schématisées sur la Figure II-9.

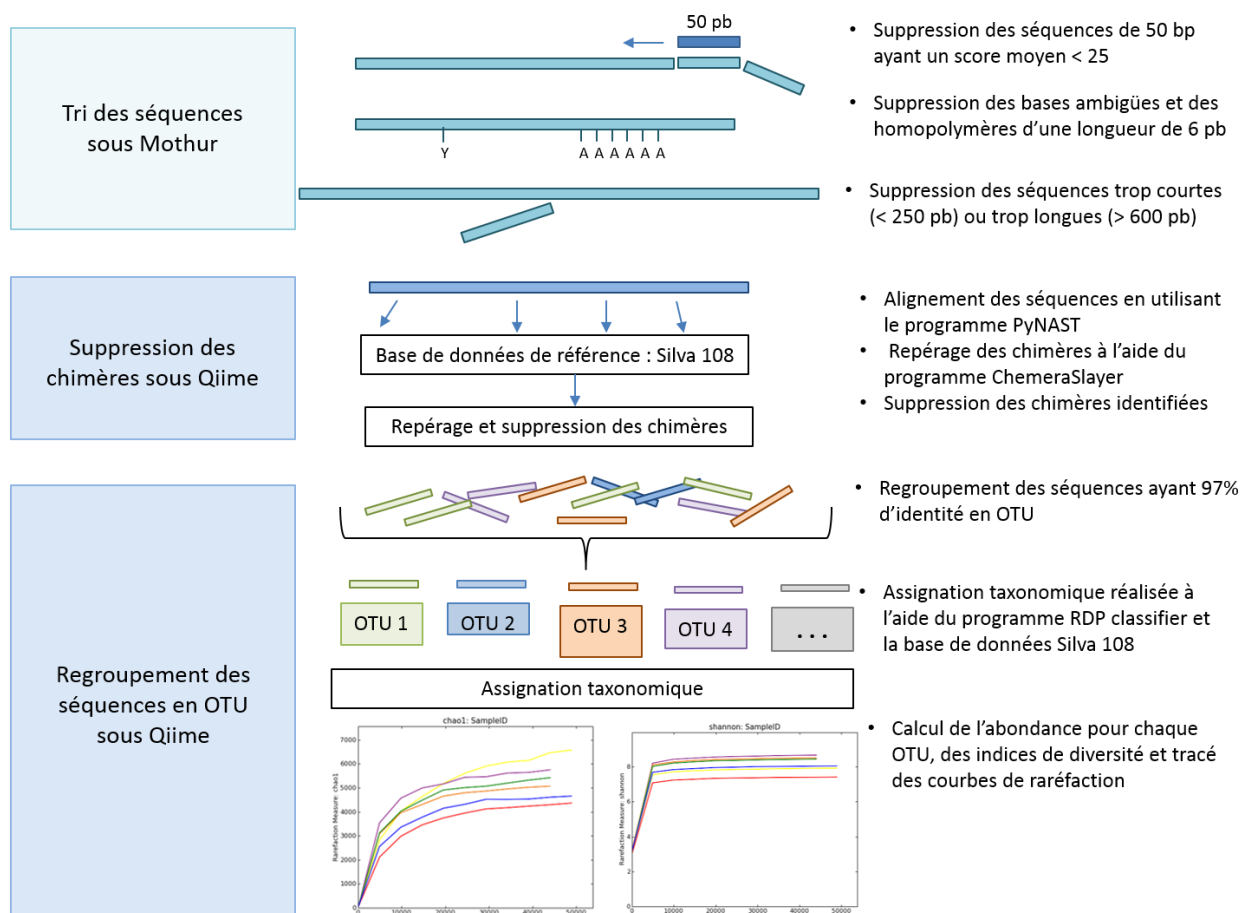


Figure II-9 : Étapes du traitement bio-informatique des données issues de l'inventaire ADNr 16S

Des analyses statistiques sous R sont ensuite réalisées afin de générer des cartes d'abondance (« heat-map ») et des analyses à composantes principales (ACP). La heat-map est générée à partir d'une matrice de données comprenant les échantillons (en colonnes) et les OTU (en lignes). Ces données sont normalisées pour chaque échantillon par le logarithme afin d'obtenir une distribution gaussienne et sont ensuite centrées réduites. La heat-map est générée par la librairie marray (<http://bioconductor.org/biocLite.R>) en utilisant la méthode de classification de Ward et le calcul de la distance selon la corrélation entre les scores d'abondance normalisée de chaque

OTU. L'ACP est calculé à l'aide de la librairie FactoMineR sur les données précédemment normalisées.

## **Chapitre III. Occurrence des dysfonctionnements biologiques et état des lieux des traitements curatifs en France**

---

Une enquête nationale a été réalisée afin d'évaluer l'occurrence des dysfonctionnements biologiques sur les stations d'épuration à boues activées françaises et de recenser les solutions curatives mises en place par les exploitants. Dans cette étude, les dysfonctionnements biologiques font référence à des problèmes de décantation et/ou de moussage dus à un développement excessif de bactéries filamenteuses. Seules les stations du type boues activées répertoriées comme fonctionnant à (très) faible charge ou aération prolongée dans la base de données nationale (BDERU 2012) ont été ciblées.

L'échantillonnage de 1000 stations d'épuration, ayant une charge de pollution organique traitée (CBPO) exprimée en équivalents-habitants (sur la base de 60 g de DBO<sub>5</sub> par EH) inférieure à 250 000 EH, a été réalisé suivant la méthode de double stratification décrite dans le paragraphe II.1.2 (page 39). L'ensemble des stations ayant une CBPO supérieure à 250 000 EH a été enquêté de façon indépendante. Le taux de réponse obtenu pour chaque sous-population est donné dans le Tableau III-1.

**Tableau III-1 : Taux de réponse au questionnaire sur les dysfonctionnements biologiques des boues activées**

<i>Charge maximale traitée de pollution organique ramenée à l'EH<sub>60g</sub> (EH)</i>	<b>Strate 1</b> < 2 000	<b>Strate 2</b> [2 000 ; 10 000[	<b>Strate 3</b> [10 000 ; 50 000[	<b>Strate 4</b> [50 000 ; 250 000[	<b>Total</b> <i>Ensemble de l'échantillon</i>	<b>Strate 5</b> > 250 000
Nombre de questionnaires envoyés	609	282	86	23	1 000	19
Nombre de réponses reçues	174	115	58	11	358	12
Taux de réponse (%)	29	41	67	48	36	63

Le taux de réponse est de l'ordre de 50 % pour les stations d'épuration recevant une charge supérieure à 2 000 EH. Le taux de réponse sur la strate 1 est nettement plus faible que pour les autres strates. De par la réglementation, les stations recevant une charge inférieure à 2 000 EH sont peu suivies, la collecte des données a donc été plus difficile. Par conséquent, les résultats obtenus seront décrits avec et sans cette catégorie de stations dans les paragraphes suivants. Le nombre de réponse étant de 358, la marge d'erreur (m) est comprise entre 2 et 5 % selon la valeur de la proportion observée (p) (cf. Annexe 8).

La strate 5 ne faisant pas partie de l'échantillonnage, elle a été traitée indépendamment des autres sous-populations. La marge d'erreur est comprise entre 8 et 18 % selon la valeur de la proportion observée (p) (cf. Annexe 8).

Les proportions estimées sur l'ensemble de la population échantillonnée ont été calculées suivant Équation II-5.

### III.1. Caractéristiques des installations échantillonnées

Pour une meilleure interprétation des résultats, une description sommaire du fonctionnement des stations d'épuration enquêtées a été demandée aux répondants de l'enquête (questionnaire en Annexe 1).

### III.1.1. Traitement de l'azote

Le traitement de l'azote a été divisé en trois catégories suivant le type de procédé mis en place :

- Aucun traitement,
- Nitrification,
- Nitrification et dénitrification.

La répartition des stations dans chacune des catégories de traitement de l'azote est donnée sur la Figure III-1.

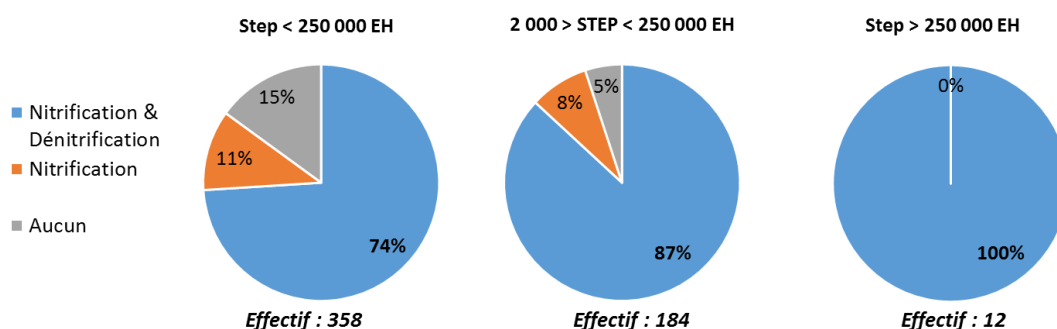


Figure III-1 : Répartition des stations en fonction des modes de traitement de l'azote

La majorité des stations d'épuration réalise un traitement poussé de l'azote avec une étape de nitrification suivie d'une étape de dénitrification.

### III.1.2. Traitement du phosphore

Le traitement du phosphore a été divisé en quatre catégories :

- Aucun traitement,
- Déphosphatation biologique,
- Déphosphatation biologique complétée par un traitement physico-chimique,
- Traitement physico-chimique seul.

La répartition des stations en fonction des différentes catégories de traitement du phosphore, est donnée sur la Figure III-2.

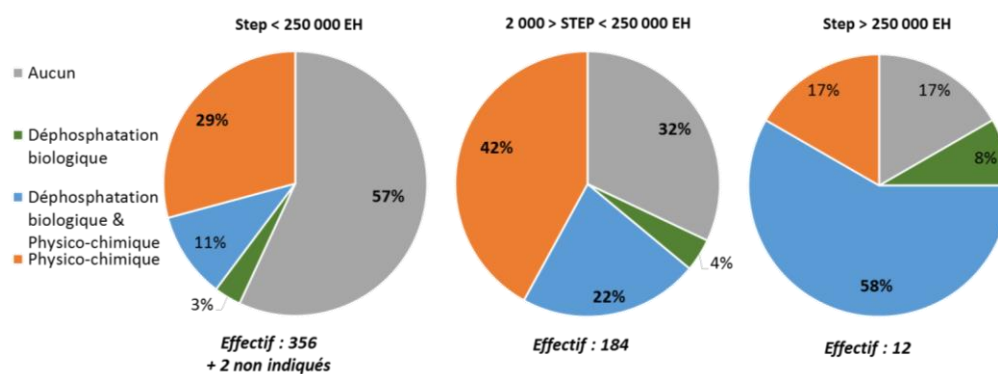


Figure III-2 : Répartition des stations en fonction des différents modes de traitement du phosphore

La majorité des stations d'épuration recevant une charge inférieure à 2 000 EH ne réalise pas de traitement du phosphore (73 %). Tandis que 64 % des installations recevant une charge comprise entre 2 000 EH et 250 000 EH réalisent un traitement du phosphore avec ajout de sels métalliques. Le taux de stations traitant le phosphore par voie biologique seule est très faible, de l'ordre de 4 %. Les stations recevant une charge supérieure à 250 000 EH réalisent en majorité un traitement physico-chimique du phosphore complémentaire à la déphosphatation biologique. Ceci leur permet d'assurer un bon traitement du phosphore tout en limitant les coûts liés à l'ajout de sels métalliques.

Les sels métalliques utilisés pour le traitement du phosphore par voie physico-chimique sont des solutions à base de sels de fer ou d'aluminium, comme indiqué sur la Figure III-3.

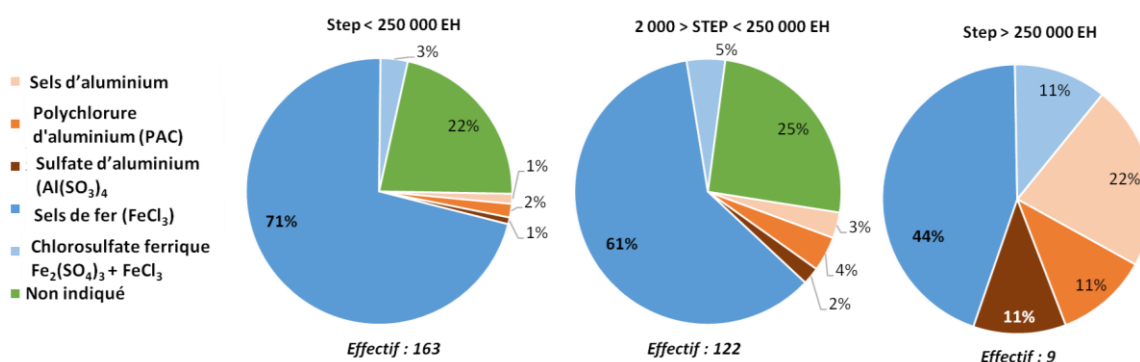


Figure III-3 : Répartition de l'utilisation des sels métalliques pour le traitement du phosphore

Les stations recevant une charge inférieure à 250 000 EH utilisent majoritairement des solutions à base de sels de fer. Les stations de plus de 250 000 EH utilisent globalement dans les mêmes proportions les sels d'aluminium et les sels de fer.

### III.1.3. Taux de charge hydraulique et organique

Les taux de charge hydraulique et organique ont été calculés à partir des charges moyennes annuelles renseignées par les exploitants. Les résultats sont donnés dans le Tableau III-2 pour chaque strate ainsi que pour l'ensemble de l'échantillon avec et sans la strate 1.

Tableau III-2 : Taux de charge hydraulique et organique des stations d'épuration

		Strate 1	Strate 2	Strate 3	Strate 4	Total	Strate 5
Taux de charge hydraulique (%)	Moyenne (effectif)	71,4 (124)	73,4 (88)	62,2 (47)	62,2 (10)	71 (268)	62,1 (9)
	Min	9,3	13,5	19,5	46,1	9,3	35,4
	Max	421,8	178,0	126,6	101,4	421,8	100,0
	Ecart-type	56,4	32,8	23,0	18,9		25,7
Taux de charge organique (%)	Moyenne (effectif)	51,4 (124)	57,4 (88)	50,1 (47)	65,4 (10)	53 (268)	56,1 (9)
	Min	0,3	9,0	17,7	45,1	0,3	33,9
	Max	213,7	153,8	100,1	109,8	213,7	92,0
	Ecart-type	34,5	28,1	22,4	22,8		17,5

En moyenne, les stations d'épuration sont chargées à 71 % de leur capacité hydraulique de dimensionnement et à 53 % de leur capacité organique. Une forte dispersion est observée notamment pour les stations recevant une charge inférieure à 2 000 EH. Ces données sont cohérentes avec celles fournies par Pujol et Arnaud (Pujol and Arnaud 2015) qui annoncent un taux de charge organique inférieur à 50 % sur un échantillon d'environ 600 stations d'épuration (toutes filières confondues).

### III.1.4. Charge massique et âge de boues

Quelques données concernant la charge massique et l'âge de boues ont été renseignées. Les résultats sont donnés dans le Tableau III-3 pour chaque strate, ainsi que pour l'ensemble de l'échantillon.

Tableau III-3 : Charge massique et âge de boues moyens

		Strate 1	Strate 2	Strate 3	Strate 4	Total	Strate 5
Charge massique (kg DBO <sub>5</sub> .(kg MVS) <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup> )	Moyenne (effectif)	0,07 (69)	0,06 (29)	0,06 (18)	0,08 (7)	0,06 (123)	0,07 (8)
	Min	0,01	0,01	0,02	0,02	0,01	0,04
	Max	0,36	0,16	0,12	0,25	0,6	0,095
	Ecart-type	0,06	0,03	0,03	0,08		0,02
Age de boues (j)	Moyenne (effectif)	36 (11)	17 (1)	18 (12)	25 (3)	29 (27)	19,1 (7)
	Min	11	17	11	20	11	14
	Max	124	17	22	31	124	26
	Ecart-type	33	.-	3,5	5,3		4,1

La charge massique moyenne est de l'ordre de 0,07 kg DBO<sub>5</sub> (kg MVS)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> et l'âge de boues de l'ordre de 29 jours. Ces valeurs sont compatibles avec un traitement poussé de l'azote généralement requis (Deronzier and Choubert 2004), avec un âge de boues relativement élevé en lien avec les sous-charges organiques précédemment notées.

### III.1.5. Suivi de la décantation

Les dysfonctionnements du type foisonnement des boues se caractérisent notamment par des problèmes de décantation à partir d'indices de boues supérieurs à 150 – 200 mL g<sup>-1</sup> (FNDAE\_33 2005). Des informations sur la mesure de cet indice ont été demandées dans le questionnaire notamment concernant le protocole employé :

- Aucune analyse de la décantabilité des boues ;
- Mesure de la vitesse de décantation en 30 minutes (VD<sub>30</sub>) seule ;
- Mesure de l'indice de Mohlman (VD<sub>30</sub> ramenée à la concentration en MES sans dilution même si la VD<sub>30</sub> est supérieure à 300 mL g<sup>-1</sup>) ;
- Mesure de l'indice de boues (VD<sub>30</sub> ramenée à la concentration en MES avec dilution des boues tant que la VD<sub>30</sub> est supérieure à 300 mL g<sup>-1</sup>).

Les données pour l'ensemble de la population et la strate 5 sont résumées sur la Figure III-4.

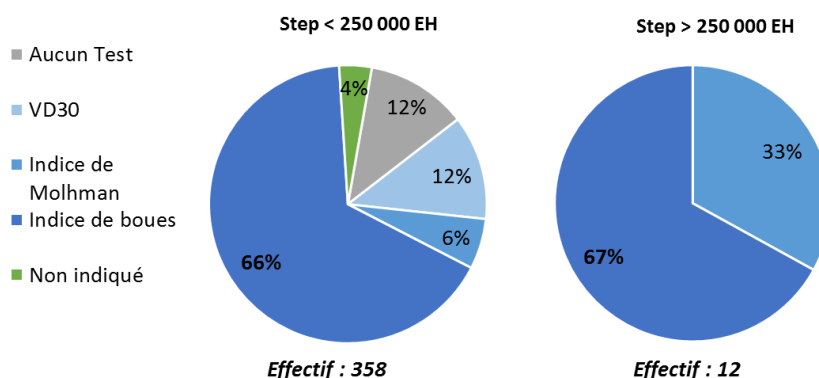


Figure III-4 : Différents protocoles mis en œuvre pour la mesure de la capacité des boues à décanter

Au moins 85 % des stations réaliseraient un suivi de la décantabilité des boues en utilisant majoritairement la mesure de l'indice de boues (67 % des répondants). Les installations ne réalisant aucun suivi de la décantation sont inférieures à 11 %, et appartiennent majoritairement aux installations inférieures à 10 000 EH. Quelques valeurs d'indice et de concentration en MES ont été indiquées. En moyenne l'indice de boues (IB) est de 162 mL g<sup>-1</sup> (35 réponses) et la concentration en MES de 4,6 g L<sup>-1</sup> (46 réponses). En une dizaine d'années, l'IB moyen a peu évolué puisqu'il était de 167 mL g<sup>-1</sup> lors de la dernière enquête réalisée par le Cemagref (Graveleau 2002). La concentration moyenne en MES est proche de la valeur préconisée de 4 g L<sup>-1</sup> (Deronzier *et al.* 2002).

### III.2. Occurrence des dysfonctionnements biologiques

Les dysfonctionnements indiqués dans les réponses au questionnaire ont été classés en trois catégories :

- **Dysfonctionnement non biologique** : un problème de décantation et/ou de moussage est survenu mais aucun développement excessif de bactéries filamenteuses n'a été observé ;
- **Dysfonctionnement biologique avéré** : un problème de décantation et/ou de moussage est survenu et un développement excessif de bactéries filamenteuses a été observé ;
- **Dysfonctionnement non identifié** : un problème de décantation et/ou de moussage est survenu mais le répondant ne sait pas s'il est dû à un développement excessif de bactéries filamenteuses ou non.

L'occurrence des problèmes de décantation et/ou de moussage suivant ces catégories est donnée sur la Figure III-5.



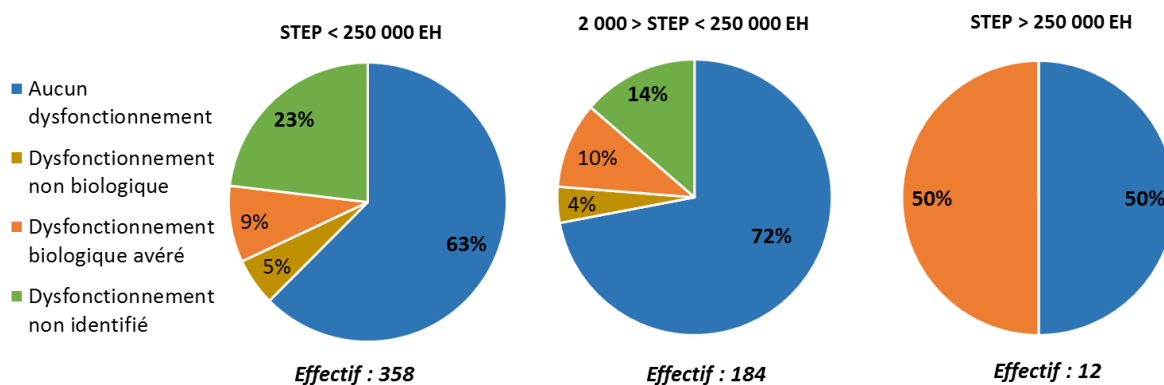


Figure III-5 : Pourcentage de stations ayant rencontré un dysfonctionnement du type décantation et/ou moussage

Environ 30 % des stations d'épuration dont la capacité est comprise entre 2 000 et 250 000 EH, connaissent des problèmes de décantation et/ou de moussage. Sur les stations recevant une charge inférieure à 2 000 EH, l'occurrence des dysfonctionnements est de 44 %. Globalement, le taux de stations ayant rencontré des dysfonctionnements non identifiés est relativement élevé notamment sur les installations inférieures à 2 000 EH. Sur l'ensemble de l'échantillon, environ 60 % des dysfonctionnements n'ont pu être caractérisés, sans doute lié au fait que la réalisation d'observations microscopiques sur site est encore rare. Il est par conséquent difficile d'estimer précisément l'occurrence des dysfonctionnements biologiques.

Ce n'est pas le cas des stations traitant une charge maximale supérieure à 250 000 EH, dont la nature des dysfonctionnements est détaillée dans le paragraphe suivant.

Afin de caractériser les dysfonctionnements, leur fréquence d'apparition a été définie de la façon suivante :

- Permanents : tout au long de l'année ;
- Récurrents : durant plusieurs mois par an, 3 à 6 mois ;
- Ponctuels : durant plusieurs semaines par an, 2 à 3 semaines, parfois plusieurs fois par an.

### III.2.1. Occurrence des dysfonctionnements biologiques sur la strate 5

Le taux de stations sujettes à un foisonnement des boues sur la strate 5 est assez élevé. Sur les six cas de dysfonctionnements biologiques recensés :

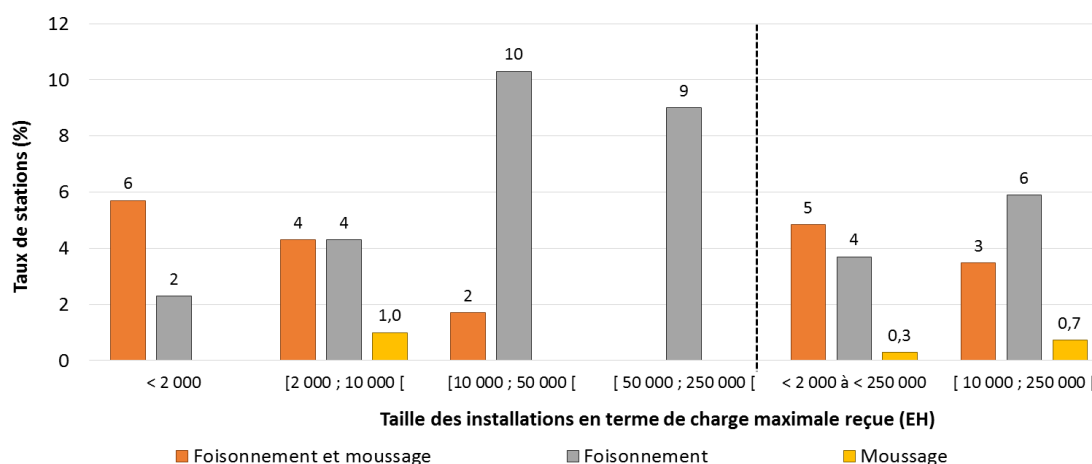
- Trois cas récurrents de foisonnement associé à du moussage, dans deux cas dû à *M. parvicella* ;
- Un cas de foisonnement récurrent induit par *M. parvicella* en présence de *Mycolata* sans que du moussage n'ait été observé ;
- Deux cas de moussages, un ponctuel et un permanent. Le cas de moussage permanent était dû à une bactérie filamenteuse décrite comme « courte et située en pourtour des floccs », très certainement *Mycolata* (Jenkins *et al.* 2004).

D'après les résultats de l'enquête, les cas de moussages et/ou foisonnements récurrents surviennent à la même période chaque année, de novembre à avril.

Pour deux des cas recensés, le dysfonctionnement est avéré pour un indice de boues supérieur à 110 - 130 mL g<sup>-1</sup>. Afin de limiter les coûts du traitement des boues par déshydratation, un traitement curatif a été mis en place dès le dépassement de ces valeurs (paragraphe III.5).

### III.2.2. Dysfonctionnements biologiques avérés

La fréquence des dysfonctionnements biologiques avérés est représentée sur la Figure III-6.



**Figure III-6 : Occurrence des dysfonctionnements biologiques avérés**

Pour l'ensemble de l'échantillon, moins de 10 % des stations sont concernées par des dysfonctionnements biologiques avérés. Les stations sont essentiellement affectées par un foisonnement des boues avec une fois sur deux du moussage biologique. L'occurrence de problèmes de moussage biologique avérés seuls est inférieure à 1 %. Ceci étant certainement dû au fait que 75 % des moussages n'ont pu être caractérisés.

Bien que le taux de dysfonctionnements biologiques avérés soit faible pour les stations de moins de 2 000 EH (8 %), le taux de stations ayant rencontré un dysfonctionnement est élevé (47 %). En effet, moins de 20 % des dysfonctionnements ont été caractérisés comme induits par des bactéries filamenteuses. La majorité des dysfonctionnements survenus pour cette catégorie de stations n'ayant pu être caractérisé, il est difficile d'estimer l'occurrence des dysfonctionnements biologiques avérés.

Les dysfonctionnements sont le plus souvent récurrents ou ponctuels, excepté sur la strate 1. Les dysfonctionnements récurrents apparaîtraient en hiver et au printemps (février – avril) et/ou lors des variations de charges saisonnières (périodes de vendanges ou estivales).

Peu de données sur l'identification des bactéries filamenteuses ont été collectées. *M. parvicella* est souvent observée, *Nostocoida limicola* est aussi fréquemment citée ainsi que les bactéries filamenteuses appartenant au phylum *Chloroflexi* (Type 0803, Type 0092 et Type 0041/0675) et *Mycolata*.

### III.2.3. Synthèse sur l'occurrence des dysfonctionnements

Pour les installations de moins de 250 000 EH, l'occurrence des problèmes de décantation est de l'ordre de  $30 \% \pm 5 \%$ , dont  $18 \% \pm 4$  associés à du moussage. Les résultats sont cohérents avec l'estimation faite en 2002 par Graveleau (Graveleau 2002; Graveleau *et al.* 2005). Il avait été mis en évidence qu'environ 25 % des stations étaient sujettes à des problèmes de décantation avec des indices de boues supérieurs à  $200 \text{ mL g}^{-1}$ . La même estimation avait été faite en 1989 (Pujol and Boutin 1989), sur l'ensemble des stations à boues activées, toute charge comprise. Un problème de décantation sur trois a été clairement identifié comme étant dû à un foisonnement des boues.

L'occurrence du moussage, seul et associé à des problèmes de décantation, est au minimum de  $5 \% \pm 2\%$  et au maximum de  $23 \% \pm 4 \%$  si l'ensemble des dysfonctionnements non identifiés correspond à un moussage biologique. Lors du recensement réalisé par Pujol *et al.* (Pujol *et al.* 1991), l'occurrence du moussage avait été estimé à 20 % sur l'ensemble des stations à boues activées, toute charge comprise, sachant que les dysfonctionnements étaient le plus fréquemment observés pour les faibles charges. Les problèmes de moussage recensés alors étaient dans 50 % des cas récurrents ou chroniques. D'après la présente étude, ils seraient davantage ponctuels, de l'ordre de quelques semaines par an. La durée des phénomènes de moussage, associés ou non à des problèmes de décantation, aurait ainsi diminué.

Pour l'ensemble de l'échantillon, 37 % des stations rencontrent des problèmes de décantation et/ou de moussage. Un dysfonctionnement sur quatre est causé par le développement excessif de bactéries filamenteuses de façon avérée. Dans 15 % des cas, il s'agit d'un dysfonctionnement non biologique. Deux dysfonctionnements sur trois n'ont pu être caractérisés notamment pour les installations de petite taille (inférieures à 10 000 EH).

D'après ces résultats, près de la moitié des stations de plus de 250 000 EH serait sujette à des dysfonctionnements biologiques.

### III.3. Liens entre l'occurrence des dysfonctionnements et le fonctionnement des installations

Afin d'établir d'éventuels liens entre le fonctionnement des stations d'épuration et l'occurrence des dysfonctionnements biologiques observés, des tests statistiques d'indépendance ( $\chi^2$ ) ont été réalisés sur l'ensemble des réponses obtenues en excluant la strate 5. D'après ces analyses, ni le type de traitement de l'azote, ni la présence d'effluents industriels n'ont d'impact significatif sur l'occurrence des dysfonctionnements. Le mode de traitement du phosphore et le taux de charge organique des stations sont quant à eux statistiquement influents. Les résultats obtenus pour ces paramètres sont décrits dans les paragraphes suivants.

### III.3.1. Occurrence des dysfonctionnements selon le mode de traitement du phosphore

L'occurrence des dysfonctionnements selon le mode de traitement du phosphore est synthétisée sur la Figure III-7.

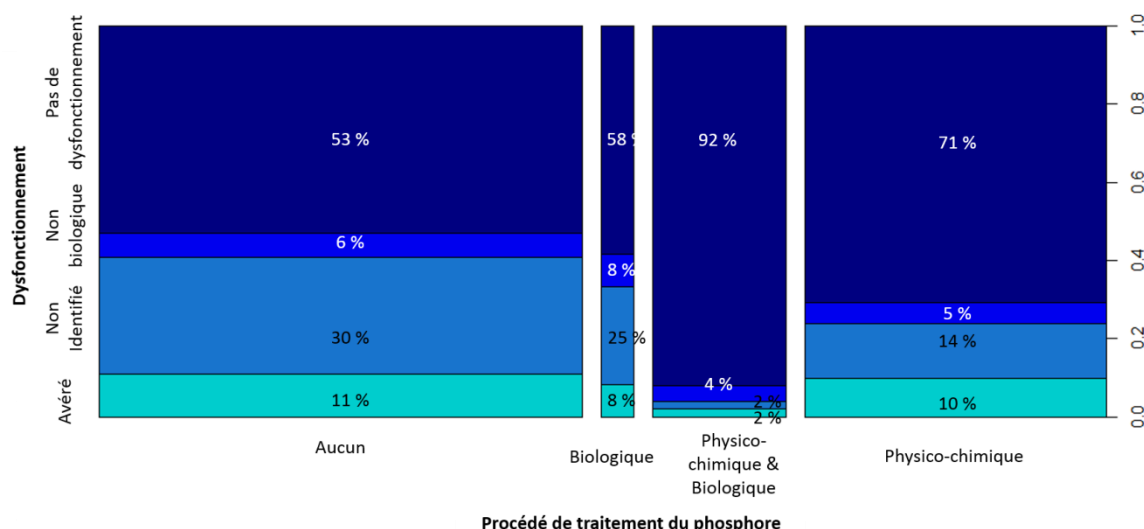


Figure III-7 : Distribution du taux de dysfonctionnements selon le procédé de traitement du phosphore - Strate 5 exclue

L'occurrence des dysfonctionnements biologiques n'est pas indépendante du mode de traitement du phosphore (probabilité critique  $p < 0,01$ ). Il n'y a pas de différence significative entre l'absence de traitement du phosphore et la présence d'un système de déphosphatation biologique seul ( $p > 0,95$ ). Par contre, les différences entre un traitement physico-chimique associé ou non avec un traitement biologique sont statistiquement significatives ( $p < 0,01$ ). L'ajout de sels métalliques diminuerait significativement l'occurrence des dysfonctionnements notamment non identifiés, d'autant plus si le procédé est couplé à une déphosphatation biologique.

Ces observations ne sont pas vérifiées pour la strate 5. En effet, l'occurrence des dysfonctionnements est indépendante du procédé de traitement du phosphore.

### III.3.2. Occurrence des dysfonctionnements selon le taux de charge hydraulique et organique de la station

Les taux de charge organique et hydraulique moyens associés ou non à un dysfonctionnement biologique avéré, non identifié ou non biologique, sont donnés dans le Tableau III-4.

Tableau III-4 : Taux de charge hydraulique et organique selon les dysfonctionnements

		Avéré	Non identifié	Non biologique	Pas de dysfonctionnement
Taux de charge hydraulique (%)	Moyenne (effectif)	70 (27)	84 (44)	80 (18)	66 (178)
	Min	21	20	41	9,3
	Max	221	422	157	242
	Ecart-type	41	71	39	34
Taux de charge organique (%)	Moyenne (effectif)	57 (27)	72 (44)	52,2 (18)	49 (178)
	Min	18	17	0,3	0,5
	Max	132	214	96,83	154
	Ecart-type	27	39	21	27

Le taux de charge hydraulique moyen pour les stations n'ayant pas rencontré de dysfonctionnement est de 66 % tandis qu'il est supérieur à 80 % pour les installations ayant rencontré un dysfonctionnement non biologique ou non identifié. Ceci est cohérent avec les facteurs identifiés comme pouvant induire des dysfonctionnements par les exploitants (paragraphe III.4), dont la dilution des eaux usées. Cependant, d'après le test ANOVA, les moyennes du taux de charge hydraulique ne sont pas significativement différentes ( $p \approx 0,07$ ). Par contre, elles le sont pour le taux de charge organique ( $p < 0,01$ ), comme illustrées sur la Figure III-8., qui présente les dysfonctionnements en fonction des taux de charge organique des installations.

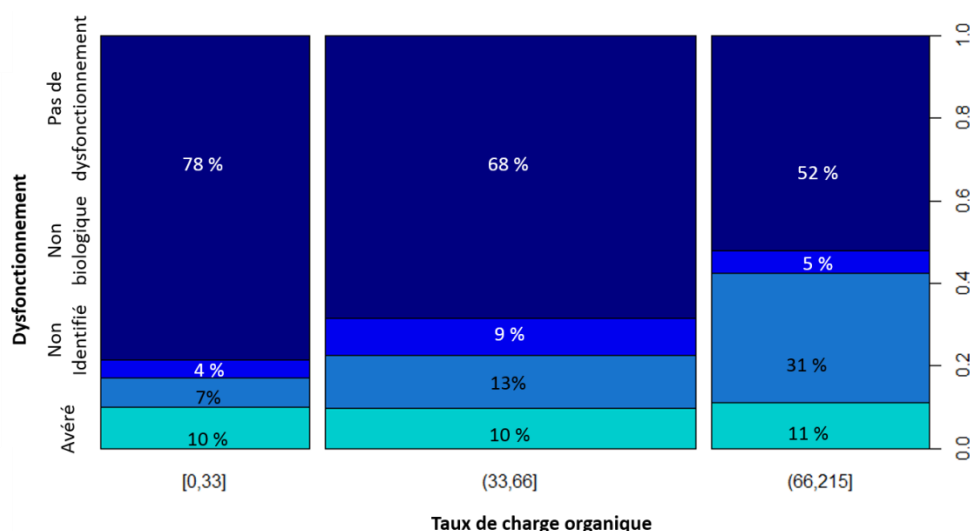


Figure III-8 : Distribution du taux de dysfonctionnements suivant le taux de charge organique - Strate 5 exclue

Les stations sont d'autant plus affectées par les dysfonctionnements non identifiés qu'elles sont chargées. La réalisation d'un test d'indépendance (test du  $X^2$ ) confirme cette observation ( $p < 0,01$ ). La plupart des dysfonctionnements non identifiés correspond aux installations recevant moins de 10 000 EH (annexe III.I.b). Les dysfonctionnements non identifiés seraient causés pour cette catégorie de stations par des taux de charge organique trop importants. Cette cause d'apparition d'un dysfonctionnement a été identifiée en cinquième position par les exploitations avec le taux de charge hydraulique.

### **III.4. Facteurs à l'origine des dysfonctionnements**

Il a été demandé aux répondants d'identifier ou d'émettre des hypothèses sur les facteurs pouvant contribuer à l'apparition des dysfonctionnements survenus sur les stations étudiées. Les réponses les plus fréquentes citent pour tous les dysfonctionnements confondus :

- La dilution des effluents par la présence d'eaux claires parasites (en moyenne 24 %) ;
- Des problèmes d'aération (en moyenne 22 %) ;
- La présence de rejets industriels (en moyenne 15 %) ;
- La concentration en boues trop élevée souvent associée à une insuffisance de l'extraction (13 %) ;
- Le dimensionnement de la station non adapté à la charge hydraulique et organique à traiter (en moyenne 11 %) et de fréquents problèmes de surcharge hydraulique (en moyenne 10 %) ;
- La filière boues non adaptée ou difficile à gérer (en moyenne 10 %).

Les facteurs le plus souvent cités sont similaires à ceux identifiés il y a dix ans. Les problèmes en lien avec le système d'aération semblent plus importants tandis que la présence d'eaux parasites dans le réseau ou les surcharges hydrauliques sont moins fréquentes. Certains exploitants ont signalé en commentaires que les problèmes d'aération sont liés à l'utilisation de turbines ou à des systèmes d'aération ayant une capacité insuffisante. L'automatisation du système d'aération aurait permis de réduire les dysfonctionnements. La vétusté des stations n'est plus un facteur majeur, certainement dû au fait qu'un certain nombre de stations a été mis à niveau au cours de ces dernières années en lien avec la réglementation.

### **III.5. Mesures mises en œuvre pour lutter contre les dysfonctionnements**

Les mesures mises en œuvre pour lutter contre les dysfonctionnements observés sont décrites dans le Tableau III-5. Au vu du nombre de réponses et pour simplifier l'analyse, celle-ci n'a pas été réalisée sur chaque strate mais sur l'ensemble de la population.

**Tableau III-5 : Types d'interventions réalisées suivant le type de dysfonctionnement observé (en nombre)**

	Décantation <i>Avéré – Non identifié</i>	Moussage <i>Avéré – Non identifié</i>	Décantation et moussage <i>Avéré – Non identifié</i>	Non biologique <i>(Décantation et moussage)</i>	Total
Traitement curatif	2 - 3	0 - 1	3 - 0	-	9
Modification des paramètres d'exploitation et traitement curatif	4 - 1	0 - 1	2 - 1	1	10
Modification des paramètres d'exploitation	6 - 1	2 - 2	10 - 8	5	34

D'après les réponses obtenues, les exploitants ont essentiellement recours aux modifications des paramètres de fonctionnement de la station d'épuration pour résoudre les dysfonctionnements. Dans certains cas, notamment pour des problèmes de décantation, un traitement curatif est mis en place.

En ce qui concerne les stations supérieures à 250 000 EH, une station sur deux rencontrant des dysfonctionnements biologiques met en place un traitement curatif de type chloration. Les paramètres de la station peuvent également être modifiés afin d'optimiser l'efficacité de traitement. Dans deux cas, il s'agit d'un traitement préventif mis en place dès que l'indice de boues est supérieur à 110 – 120 mL g<sup>-1</sup> afin de limiter les problèmes de déshydratation des boues dus aux bactéries filamenteuses. Dans deux autres cas, l'aération et/ou la concentration en MES dans le système ont été ajustées. Dans un cas de moussage, afin d'ajuster la charge massique, l'exploitant a arrêté l'un des bassins biologiques, une partie de l'influent a été directement redirigée sur le système biologique sans passer par le décanteur primaire et l'extraction des boues a été augmentée.

Pour les autres cas observés, la liste des différents traitements curatifs appliqués est donnée dans le Tableau III-6 et la liste des paramètres d'exploitation modifiés dans le Tableau III-7.

Tableau III-6 : Liste des traitements curatifs mis en place

Traitement curatif	Décantation	Moussage	Décantation et moussage associés	Dosage et commentaires
Chloration	2		1	- 0,05 L m <sup>-3</sup> le 1 <sup>er</sup> jour et 0,1 L m <sup>-3</sup> les jours suivants durant 2 semaines - 2 g de chlore actif par kg de MS dans la recirculation - Ajustement de l'aération
Coagulant organique	1			Marque SNF
Argile et polymère	1			Retour des boues dans le bassin tampon
Polymère		1	1	- Ajustement de l'aération et de la recirculation - SNF EM 430 (solution de polyacrylamide anionique) en traitement choc 25 kg j <sup>-1</sup> le 1 <sup>er</sup> jour puis 10 kg j <sup>-1</sup> durant 3 jours sur une installation traitant en moyenne 900 m <sup>3</sup> j <sup>-1</sup> (avec diminution de l'aération et bypass d'une partie de l'influent).
Solution commerciale à base de sels d'aluminium	1			Filafloc : 850 kg Al an <sup>-1</sup> (installation traitant en moyenne 540 m <sup>3</sup> j <sup>-1</sup> ), Lestage des boues avec des floccs plus gros
Chlorure d'aluminium			1	Ajout durant 3 semaines
Sels de fer	1			
Sels de fer + chloration	1			
Sels de fer + lestant		1		
Lestant (cendres)	1			Ajout de 50 à 100 kg par semaine dans les bassins d'aération sur une installation traitant en moyenne 70 m <sup>3</sup> j <sup>-1</sup> . Traitement en place depuis plusieurs années.
Talc	1			Ajout ponctuel (150 kg sur une installation traitant en moyenne 640 m <sup>3</sup> j <sup>-1</sup> ) Effet limité dans le temps complété par des injections d'hypochlorite de sodium sur la recirculation
Produit anti-mousse			1	Kemazur : peu efficace



**Tableau III-7 : Liste des paramètres de fonctionnement modifiés pour lutter contre les dysfonctionnements biologiques**

Paramètres modifiés sur la station	Décantation	Moussage	Décantation et moussage
<b>Ajustement de la concentration en boues (extraction, recirculation, etc.)</b>	<b>11</b>	<b>2</b>	<b>9</b>
<b>Action sur le système d'aération</b>	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>9</b>
By-pass d'une partie des effluents		2	1
Arrêt de la station (pour éviter les pertes de boues)			1
Retour des boues sur le bassin tampon	1		
Ensemencement par boues extérieures	1		
Curage du clarificateur	1		
Extension de la station			1
Réparation de la lame de fond du clarificateur		1	

Les principaux paramètres modifiés sont l'ajustement de la concentration en boues dans le système et de l'aération. Ces ajustements correspondent aux recommandations des SATESE rapportées dans l'étude de Graveleau *et al.* (2002).

La chloration est l'un des traitements curatifs le plus souvent mis en place. Afin d'éviter l'utilisation de la chloration qui peut engendrer une altération des rendements épuratoires (paragraphe 1.4.2.1), certains exploitants préfèrent utiliser des coagulants. Cinq cas d'utilisation de sels métalliques ont été recensés dont deux solutions contenaient de l'aluminium et trois du fer. L'utilisation des sels métalliques a été associée à d'autres types de traitements tels que la chloration ou l'utilisation de lestants. Un traitement à base de polyacrylamide anionique a également été mis en place pour lutter contre le moussage. Peu d'études ont été menées sur l'utilisation de ce type de solution.

### III.6. Conclusions

D'après l'enquête réalisée, près de 30 % des stations rencontrent toujours des problèmes de décantation. Ce dysfonctionnement a été associé à un développement excessif de bactéries filamenteuses de façon avérée dans un cas sur trois. La démarche, la méthode et les objectifs étant différents, il est difficile de comparer les résultats obtenus avec ceux des précédentes enquêtes et ainsi de préciser une tendance évolutive de l'occurrence des dysfonctionnements. Cependant, les ordres de grandeurs en termes d'occurrence des dysfonctionnements sont similaires.

5 à 23 % des installations connaissent des problèmes de moussage, le plus souvent ponctuels. Leur durée semble avoir diminué par rapport aux résultats des études antérieures.

En ce qui concerne les stations recevant une charge maximale supérieure à 250 000 EH, une station sur deux est sujette à des dysfonctionnements biologiques. Le plus souvent il s'agit d'un foisonnement des boues associé dans 75 % des cas à du moussage, causé le plus souvent par *M. parvicella*.

Les facteurs cités comme favorisant l'apparition de ces dysfonctionnements sont la dilution de l'influent par la présence d'eaux claires parasites dans le réseau ou des carences en oxygène. Les résultats de l'enquête réalisée ont par ailleurs clairement montré l'impact positif d'un traitement du phosphore par voie physico-chimique sur l'occurrence des dysfonctionnements. Ces derniers sont d'autant plus fréquents que le taux de charge de l'installation est élevé.

Les exploitants ont peu recours à l'utilisation d'un traitement curatif, préférant ajuster les paramètres de fonctionnement de la station tels que la concentration en MES dans le système et l'aération. Cependant, un traitement curatif sur trois contient des sels métalliques.

Peu de données sur les bactéries filamenteuses impliquées dans les dysfonctionnements biologiques sont disponibles. Les répondants à l'enquête citent cependant *M. parvicella*, les bactéries filamenteuses appartenant au phylum *Chloroflexi* (Type 0803, Type 0092 et Type 0041/0675) et Mycolata. Ces indications sont cohérentes avec l'étude récente de Mielczarek *et al.* (Mielczarek *et al.* 2012) réalisée sur le parc des stations d'épuration danoises à boues activées.

## **Chapitre IV. Consolidation des données requises pour l'analyse du fonctionnement du pilote et le suivi quantitatif des biomasses**

---

Deux séries de mesures avec injection de sels métalliques ont été réalisées sur le pilote semi-industriel (PILBIO) présenté au paragraphe II.2.1. Les objectifs étaient d'étudier l'impact de ces sels métalliques sur les boues activées et de préciser les doses à injecter pour lutter contre les dysfonctionnements dus à la prolifération de *M. parvicella*.

Avant d'étudier l'impact de ces ajouts dans le détail (chapitre V), et étant donné les variations observées lors des mesures, il est apparu nécessaire de consolider les données de fonctionnement du pilote qui sont utilisées dans les chapitres suivants.

Deux questions principales relatives aux données acquises au cours des suivis ont été posées :

- Peut-on différencier les évolutions de biomasse dans le pilote liées au fonctionnement du pilote de celles induites par l'ajout des sels métalliques ?
- Comment interpréter les résultats obtenus en PCR quantitative ?

Pour répondre à la première question, les données de fonctionnement du pilote ont été analysées et consolidées à l'aide de la méthodologie proposée par Rieger *et al.* (2013). Le fonctionnement du pilote a par ailleurs été modélisé pour l'une des périodes analysées (suivi  $\text{AlCl}_3$ ), afin de mieux comprendre l'origine des variations observées. L'analyse de ces données et le modèle développé sont présentés dans le premier paragraphe de ce chapitre.

L'interprétation des résultats obtenus lors de la quantification des biomasses d'intérêt par PCR quantitative fait l'objet du second paragraphe de ce chapitre. Elle repose notamment sur l'estimation des incertitudes de mesures.

## IV.1. Condition des mesures

Un premier suivi a été réalisé de janvier à juin 2012 (Tableau II-5). L'expérimentation a consisté en deux essais successifs d'injection de chlorures d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ). Les doses journalières en aluminium appliquées lors de ces essais, rapportées à la masse en MES dans le pilote, sont représentées sur la Figure IV-1.

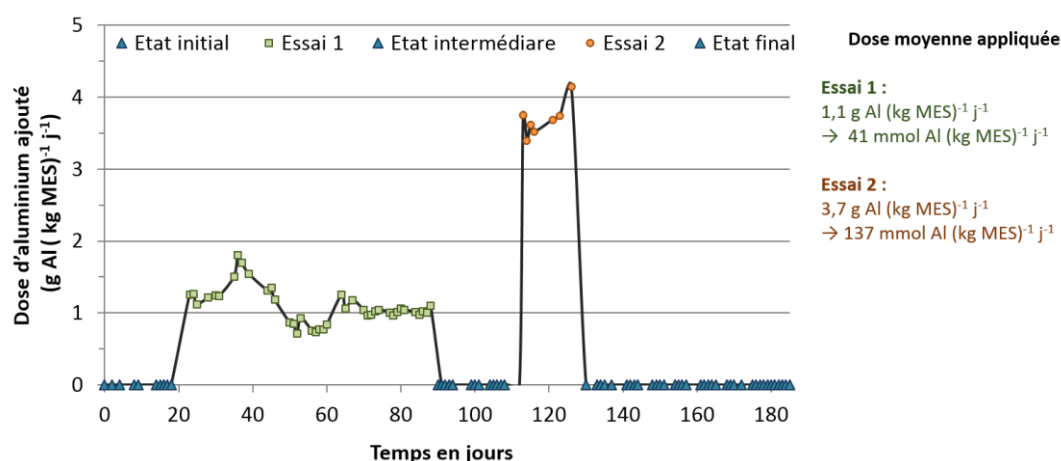


Figure IV-1 : Dose d'aluminium ajouté rapportée à la masse de MES dans le pilote – Suivi  $\text{AlCl}_3$

L'objectif du premier essai était de stabiliser l'indice de boues à une valeur inférieure à  $150 \text{ mL g}^{-1}$ . La dose d'aluminium appliquée, comprise entre  $0,7$  et  $1,8 \text{ g Al (kg MES)}^{-1} \text{ j}^{-1}$ , est restée en-dessous du dosage recommandé dans la littérature pour le contrôle du foisonnement filamenteux.

Le second essai visait à améliorer rapidement la capacité des boues à décanter. La dose appliquée lors de cet essai, comprise entre  $3,4$  et  $4,1 \text{ g Al (kg MES)}^{-1} \text{ j}^{-1}$ , est située dans la gamme supérieure de la dose recommandée pour le traitement du foisonnement filamenteux. Les variations du dosage lors des essais sont liées aux variations du débit d'alimentation et de la masse en MES dans le système (cf. paragraphe IV.2).

Un second suivi a été réalisé de janvier à juin 2011 sur le même pilote. Cette expérimentation consistait à injecter un mélange de chlorures d'aluminium et de chlorures de fer ( $\text{Al-Fe-Cl}_3$ ) de février à mai 2011 sur le même pilote. L'objectif de cet essai était d'évaluer l'efficacité d'un mélange de sels métalliques (aluminium et fer) pour le contrôle du foisonnement et du moussage induits par *M. parvicella*, et de comparer les résultats avec ceux obtenus lors d'ajout d'aluminium seul. Les doses journalières en aluminium et en fer appliquées, rapportées à la masse de MES dans le pilote, sont rapportées sur la Figure IV-2.

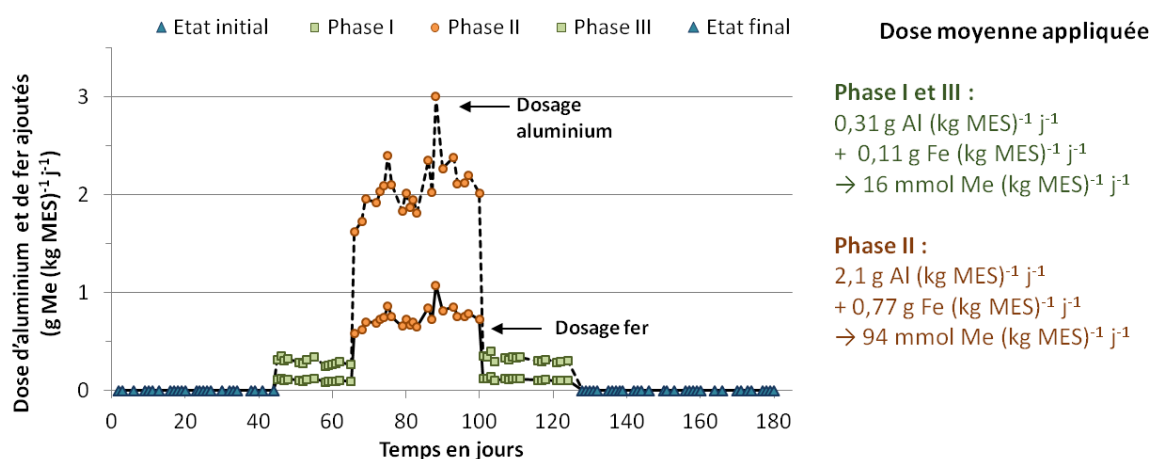


Figure IV-2 : Dose en sels métalliques ajoutés rapportée à la masse de MES dans le système – Suivi  $\text{Al-Fe-Cl}_3$

La dose appliquée lors des phases I et III était bien en-dessous des doses recommandées dans la littérature pour le contrôle du foisonnement ( $1,5$  à  $4,5 \text{ g Al (kg MES)}^{-1} \text{ j}^{-1}$  soit de  $55$  à  $167 \text{ mmol Me (kg MES)}^{-1} \text{ j}^{-1}$ ) (Roels *et al.* 2002). Tandis que le dosage en aluminium appliqué en phase II se situait dans la partie médiane de la gamme recommandée, à laquelle a été ajoutée une fraction de sels de fer.

Au cours de ces deux séries de mesures, le fonctionnement du pilote et la biologie des boues activées ont été suivis avant, pendant et après injection des sels métalliques. Les performances épuratoires du pilote, incluant la capacité des boues à décanter, ont été analysées sur une période de 6 mois pour chacun des suivis.

## IV.2. Caractérisation du fonctionnement du pilote

### IV.2.1. Consolidation des données

Le synoptique du pilote indiquant l'emplacement des débitmètres et des préleveurs est décrit au paragraphe II.2.1, de même que les mesures physico-chimiques réalisées au paragraphe II.2.1.

#### IV.2.1.1. Débits

Un bilan hydraulique a été réalisé sur le système biologique, après la décantation primaire, suivant l'Équation II-6 décrite dans la partie II. L'écart entre les débits entrant et sortant, rapporté au débit entrant est présenté sur la Figure IV-3 pour les deux suivis.

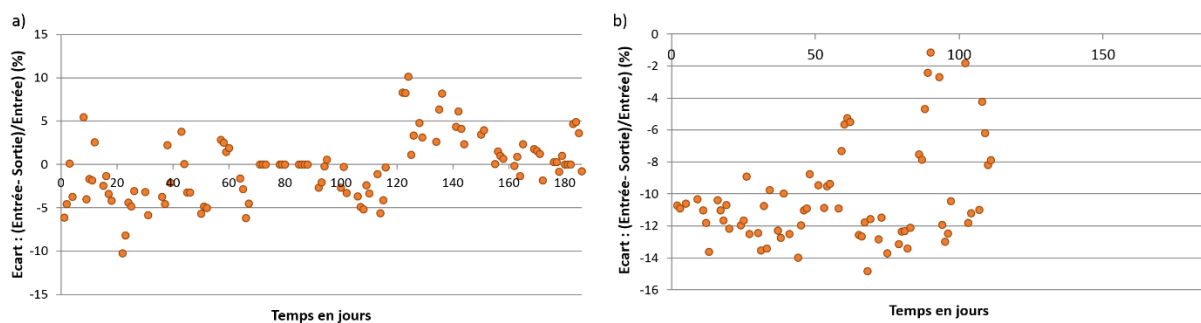


Figure IV-3. Bilan hydraulique : écart entre les débits entrants et sortants du système biologique  
a) suivi  $\text{AlCl}_3$  – b) suivi  $\text{Al-Fe-Cl}_3$

Pour le suivi  $\text{AlCl}_3$ , l'écart entre débits entrant et sortant est de 1 % en moyenne avec un écart maximal de 10 %. Ces résultats permettent de valider l'ensemble des débits considérés pour cette série.

En ce qui concerne le suivi  $\text{Al-Fe-Cl}_3$ , l'écart entre les débits entrant et sortant étant en moyenne de 10 % sur les données collectées, le bilan hydraulique ne peut être considéré comme validé. L'analyse croisée des débits a mis en évidence que le débit de l'effluent était erroné sur cette période. De plus, à partir du jour 114, les données du débit de l'effluent n'ont plus été collectées à cause d'un problème dû à la supervision.

Le débit de l'effluent pour le suivi  $\text{Al-Fe-Cl}_3$  a par conséquent été recalculé à partir de l'équation suivante :

$$Q_{\text{Eff}} = Q_{\text{ED}} - (Q_{\text{B ext}} + Q_{\text{B Rcl}})$$

Équation IV-1

Avec :

$Q_{\text{ED}}$  : débit en sortie du décanteur primaire ( $\text{m}^3 \text{ j}^{-1}$ ),

$Q_{\text{Eff}}$  : débit de l'effluent ( $\text{m}^3 \text{ j}^{-1}$ ),

$Q_{\text{B ext}}$  : débit d'extraction des boues ( $\text{m}^3 \text{ j}^{-1}$ ),

$Q_{\text{B rcl}}$  : volume journalier de boues raclées en surface du clarificateur ( $\text{m}^3 \text{ j}^{-1}$ ).

### IV.2.1.2. Concentrations de l'influent

L'analyse croisée des concentrations et des ratios caractéristiques, selon la méthode pragmatique présentée dans le chapitre 2, a été réalisée une première fois sur le jeu de données global puis une seconde fois sur les données de temps de pluie et de temps sec (paragraphe IV.2.2.1). Cette procédure permet de détecter les valeurs aberrantes. En fonction du paramètre considéré, entre 89 % et 98 % des données ont été validées sur l'influent avant et après décantation primaire.

Un extrait des distributions des concentrations retenues en entrée de l'étage biologique (après décantation primaire) est représenté sur la Figure IV-4 pour les deux suivis.

Ces données montrent des concentrations en polluants majeurs similaires au cours des deux séries de mesures.

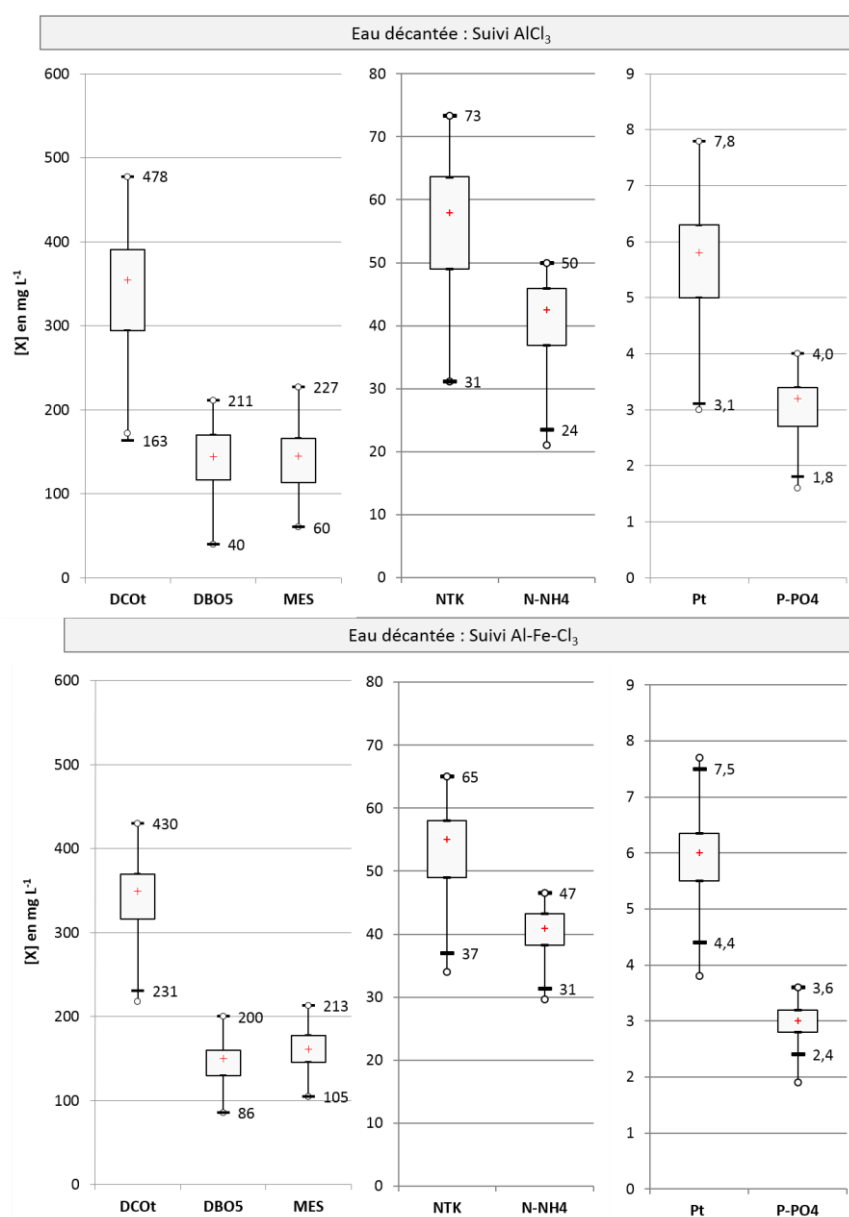


Figure IV-4. : Extrait des distributions obtenues pour les données de concentrations après décantation primaire pour les deux séries de mesures

### ***IV.2.1.3. Bilan phosphore***

Le bilan sur le paramètre phosphore étant par définition un bilan fermé, il a permis d'évaluer et de valider le jeu de données. Il est considéré comme validé lorsqu'il est bouclé à  $100 \pm 10 \%$  (Rieger *et al.* 2013). Les analyses de la concentration en phosphore des boues racless n'ayant été effectuées que deux fois par semaine, une interpolation linéaire a été réalisée pour les données manquantes.

Pour boucler le bilan matière sur le phosphore pour le suivi  $\text{AlCl}_3$ , quatre périodes ont été sélectionnées car considérées comme stables, au regard des variations de concentration en MES (décrites dans le paragraphe IV.2.2.5) :

- Période 1 durant l'état initial : jours 2 à 18,
- Période 2 durant l'essai 1 : jours 70 à 86,
- Périodes 3 et 4 durant l'état final : jours 141 à 151 et jours 161 à 178.

Les bilans effectués sur le phosphore total pour ces quatre périodes sont présentés dans le Tableau IV-1. Les écarts observés entre l'entrée et la sortie du système sont légèrement supérieurs à la tolérance de 10 % pour la période 2. Au vu du fonctionnement non stabilisé du pilote durant ce suivi, notamment en termes de concentration en MES, les données ont été considérées comme validées.

Pour le suivi  $\text{Al-Fe-Cl}_3$ , l'ensemble de la période a été considéré. Bien que l'écart observé entre l'entrée et la sortie du système soit légèrement supérieur à la tolérance de 10 %, les données ont également été considérées comme validées.



**Tableau IV-1. Bilans sur le paramètre phosphore total pour les différents suivis**

Période	Nombre de jours	$\phi P$ Eau décantée	$\phi P$ boues extraites	$\phi P$ effluent	$\phi P$ boues raclées	$\Delta$ masse en P	$\Sigma \phi P$ entrée	$\Sigma \phi P$ sortie	Bilan
jours	jours	g P j <sup>-1</sup>	g P j <sup>-1</sup>	g P j <sup>-1</sup>	g P j <sup>-1</sup>	g P j <sup>-1</sup>	g P j <sup>-1</sup>	g P j <sup>-1</sup>	%
<i>Suivi <math>AlCl_3</math></i>									
2 à 18	16	1637	886	172	355	66	1637	1481	-9,6
70 à 86	16	1907	1275	117	211	71	1907	1674	-12
141 à 151	10	1690	1032	118	170	418	1690	1739	2,9
161 à 178	17	1447	604	481	327	-7	1447	1390	-3,0
<i>Suivi <math>Al-Fe-Cl_3</math></i>									
0 à 180	181	1570	808	204	368	20	1570	1400	10,8

**Tableau IV-2. Bilans sur le paramètre aluminium pour les différents suivis**

Période	Nombre de jours	$\phi Al$ Eau décantée	$\phi Al$ injecté	$\phi Al$ boues extraites	$\phi Al$ effluent	$\phi Al$ boues raclées	$\Delta$ masse en Al	$\Sigma \phi Al$ entrée	$\Sigma \phi Al$ sortie	Bilan
jours	jours	g Al j <sup>-1</sup>	g Al j <sup>-1</sup>	g Al j <sup>-1</sup>	g Al j <sup>-1</sup>	g Al j <sup>-1</sup>	g Al j <sup>-1</sup>	g Al j <sup>-1</sup>	g Al j <sup>-1</sup>	%
<i>Suivi <math>AlCl_3</math></i>										
2 à 18	16	102	0	68	8	33	-12	102	97	6,6
70 à 86	16	109	542	488	31	86	8	651	613	6,1
161 à 178	17	89	0	77	9	69	-58	89	97	-8,9
<i>Suivi <math>Al-Fe-Cl_3</math></i>										
0 à 180	181	129	246	258	25	56	7	375	347	7,7

**Tableau IV-3. Bilans sur le paramètre fer pour le suivi  $Al-Fe-Cl_3$** 

Période	Nombre de jours	$\phi Fe$ Eau décantée	$\phi Fe$ injecté	$\phi Fe$ boues extraites	$\phi Fe$ effluent	$\phi Fe$ boues raclées	$\Delta$ masse en Fe	$\Sigma \phi Fe$ entrée	$\Sigma \phi Fe$ sortie	Bilan
jours	jours	g Fe j <sup>-1</sup>	g Fe j <sup>-1</sup>	g Fe j <sup>-1</sup>	g Fe j <sup>-1</sup>	g Fe j <sup>-1</sup>	g Fe j <sup>-1</sup>	g Fe j <sup>-1</sup>	g Fe j <sup>-1</sup>	%
0 à 180	181	138	89	99	70	29	2	227	197	13,3

#### IV.2.1.4. Bilan sur l'aluminium et le fer

Afin de suivre le devenir de l'aluminium et du fer après leur ajout dans les liqueurs mixtes, un bilan matière a été réalisé. Les fréquences d'analyse s'étant révélées insuffisantes pour obtenir un bilan satisfaisant, plusieurs hypothèses ont été formulées afin d'estimer les valeurs manquantes.

##### IV.2.1.4.1. Estimation de la concentration en aluminium et en fer dans l'eau décantée

Les concentrations en aluminium dans l'influent après décantation primaire ont été recalculées à partir de la concentration en phosphore particulaire pour le suivi  $\text{AlCl}_3$  et à partir de la concentration en matières minérales en suspension (MMS) pour le suivi  $\text{Al-Fe-Cl}_3$ . Les corrélations correspondantes ainsi que les régressions linéaires utilisées sont représentées sur la Figure IV-5.

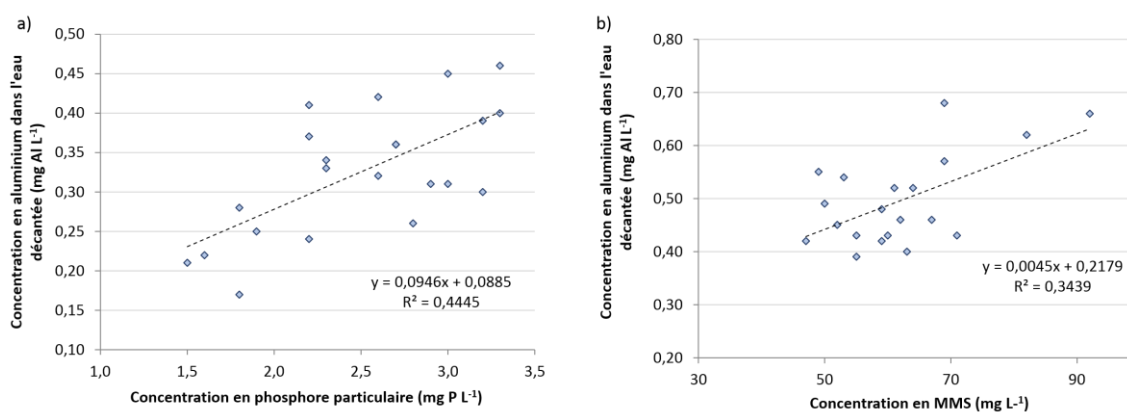


Figure IV-5. Relation entre les concentrations en aluminium dans l'eau décantée et les concentrations en phosphore particulaire (a - Suivi  $\text{AlCl}_3$ ) et en MMS (b - Suivi  $\text{Al-Fe-Cl}_3$ )

Lors du suivi  $\text{Al-Fe-Cl}_3$ , les concentrations en fer dans l'influent ont évolué de façon linéaire dans le temps comme illustré sur la Figure IV-6, et non en fonction d'un autre paramètre. Les concentrations ont donc été recalculées en fonction de ces deux régressions linéaires.

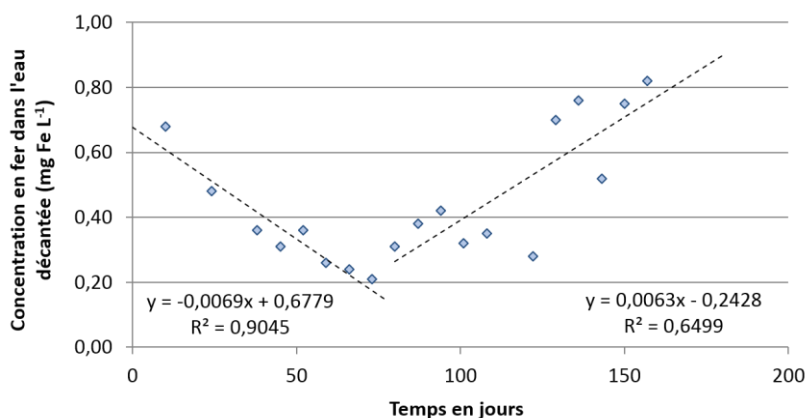


Figure IV-6 : Evolution de la concentration en fer au cours du temps dans l'eau décantée – suivi  $\text{Al-Fe-Cl}_3$

#### IV.2.1.4.2. Estimation de la concentration en sels métalliques dans les liqueurs mixtes

Pour le suivi  $\text{AlCl}_3$ , La concentration en aluminium dans les liqueurs mixtes a été estimée à partir du ratio de la concentration en aluminium sur la concentration en matières minérales en suspension  $[\text{Al}]_{\text{LM}}/[\text{MMS}]_{\text{LM}}$ . Une régression linéaire a été réalisée à partir des données observées pour chaque phase du suivi (Figure IV-7). La régression linéaire « État stable » correspond aux périodes où la concentration en aluminium a atteint un minimum de  $9 \text{ mg Al L}^{-1}$  après les phases d'ajout.

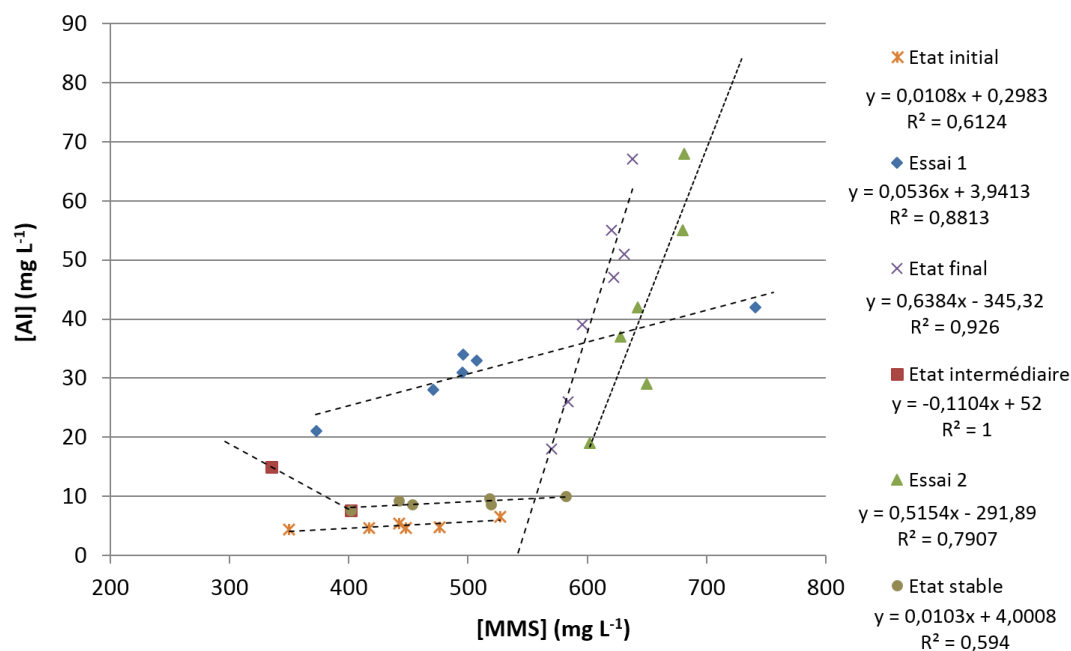


Figure IV-7. Concentration en aluminium en fonction des matières minérales en suspension (MMS) pour les différentes phases du suivi  $\text{AlCl}_3$

La concentration en aluminium a été recalculée pour chaque phase selon les équations présentées sur la Figure IV-7 à partir des concentrations des matières minérales en suspension mesurées. Il a été ainsi supposé que la totalité de l'aluminium était sous forme particulaire, en accord avec les résultats de Choubert *et al.* (2011).

La même méthodologie a été appliquée pour le suivi  $\text{Al-Fe-Cl}_3$ . Ainsi, la concentration en aluminium dans les liqueurs mixtes a pu être estimée les jours où il n'y avait pas eu d'analyse pour les deux suivis. La comparaison des valeurs mesurées et estimées est présentée sur la Figure IV-8.a. L'écart entre les concentrations en aluminium mesurées et estimées dans les liqueurs mixtes est en moyenne de 8,8 % pour le suivi  $\text{AlCl}_3$  et de 5,3 % pour le suivi  $\text{Al-Fe-Cl}_3$ , ce qui valide les calculs réalisés et les hypothèses associées.

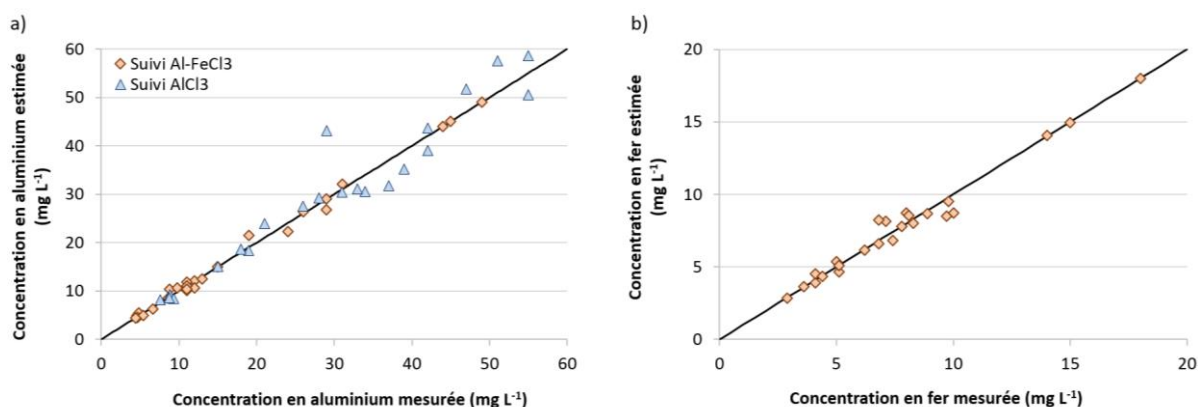


Figure IV-8 : Concentration en aluminium estimée et mesurée pour le suivi  $\text{AlCl}_3$  (a) et  $\text{Al-Fe-Cl}_3$  – Concentration en fer estimées et mesurée pour le suivi  $\text{Al-Fe-Cl}_3$  (b)

La même méthodologie a été appliquée pour estimer les concentrations en fer dans les liqueurs mixtes (Figure IV-8.b). L'écart entre les concentrations en fer mesurées et estimées est en moyenne de 5,5 % pour le suivi  $\text{Al-Fe-Cl}_3$ .

#### IV.2.1.4.3. Estimation de la concentration en aluminium et en fer dans l'effluent du pilote

La concentration en sels métalliques dans l'effluent était le plus souvent en-dessous de la limite de détection de la méthode de mesure ( $< 0,1 \text{ mg L}^{-1}$  pour l'aluminium et  $< 0,2 \text{ mg L}^{-1}$  pour le fer). Par conséquent, l'ensemble des valeurs a été recalculé à partir du ratio  $[\text{Me}]_{\text{P.LM}}/[\text{MMS}]_{\text{LM}}$ . La concentration en MVS n'étant pas mesurée dans l'effluent, elle a été estimée à partir du ratio  $[\text{MVS}]_{\text{LM}}/[\text{MES}]_{\text{LM}}$ .

Ainsi, la concentration en sels métalliques dans l'effluent a été calculée comme suit :

$$[\text{Me}]_{\text{Eff}} = [\text{MES}]_{\text{Eff}} \times \left( 1 - \frac{[\text{MVS}]_{\text{LM}}}{[\text{MES}]_{\text{LM}}} \right) \times \frac{[\text{Me}]_{\text{P.LM}}}{[\text{MMS}]_{\text{LM}}} + [\text{Me}]_{\text{S.LM}}$$

Équation IV-2

Avec :

$[\text{Me}]_{\text{Eff}}$  : concentration en sels métalliques (Al ou Fe) dans l'effluent ;

$[\text{MES}]_{\text{Eff}}$  et  $[\text{MES}]_{\text{LM}}$  : concentration en MES dans l'effluent et dans les liqueurs mixtes ;

$[\text{MVS}]_{\text{Eff}}$  et  $[\text{MVS}]_{\text{LM}}$  : concentration en MVS dans l'effluent et dans les liqueurs mixtes ;

$[\text{MMS}]_{\text{LM}}$  : concentration en MMS dans les liqueurs mixtes ;

$[\text{Me}]_{\text{P.LM}}$  : concentration en sels métalliques particuliers dans les liqueurs mixtes ;

$[\text{Me}]_{\text{S.LM}}$  : concentration en sels métalliques solubles dans les liqueurs mixtes, considérée comme nulle pour l'aluminium et égale à 2,7 % du fer total pour le fer.

D'après Choubert *et al.* (2011), la fraction soluble du fer serait légèrement plus élevée que celle de l'aluminium. La fraction soluble a été calculée en considérant qu'elle correspondait à 2,7 % de la concentration totale en fer dans les liqueurs mixtes. La concentration en fer recalculée dans l'effluent est cohérente avec les gammes mesurées par Buzier *et al.* (2011) en sortie de stations d'épuration sur le bassin de la Seine.

#### ***IV.2.1.4.1. Estimation de la concentration en aluminium et en fer dans les boues extraites***

La concentration en sels métalliques dans les boues extraites et raclées n'ayant pas été analysée, elle a été estimée à partir du ratio  $[Me]_{LM}/[MMS]_{LM}$  et de la concentration en MMS des boues recirculées et raclées, respectivement. La fraction dissoute a été prise en compte pour l'estimation des concentrations en fer.

#### ***IV.2.1.4.2. Résultat du bilan***

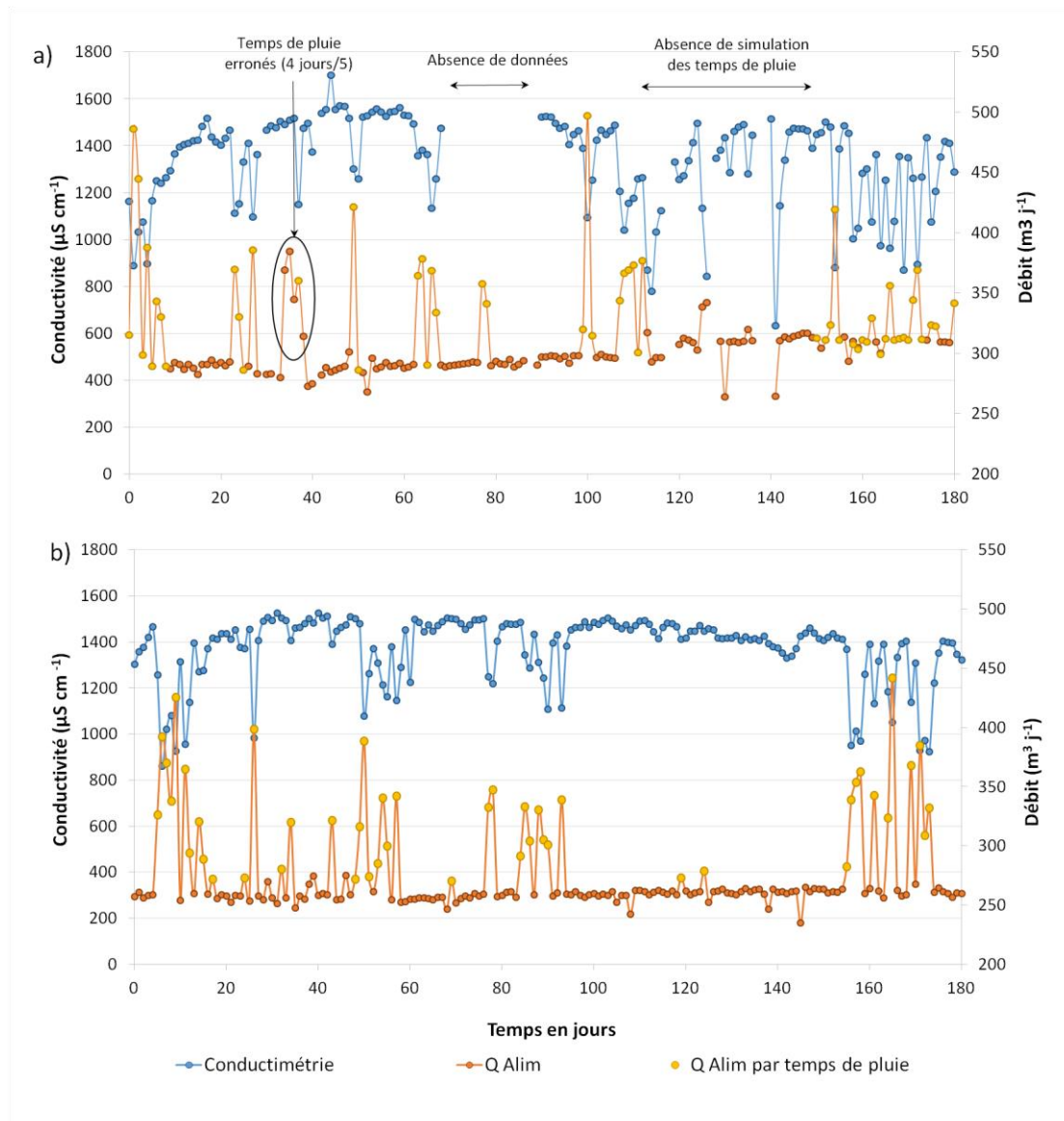
Les bilans sur l'aluminium et le fer étant, comme celui du phosphore, fermés, ils sont considérés comme validés lorsqu'ils bouclent à  $100 \pm 10\%$ . Les résultats des bilans sur l'aluminium et le fer, rapportés dans le Tableau IV-2 et dans le Tableau IV-3, valident les données et les hypothèses de calcul pour les périodes les plus stables du suivi  $AlCl_3$  et l'ensemble du suivi  $Al-Fe-Cl_3$ .

Ces résultats montrent que l'aluminium est en grande partie adsorbé sur les boues. Etant attaché à la matière particulaire (Choubert *et al.* 2011), il est peu surprenant de retrouver 90 % de l'aluminium entrant (dosage et influent) dans les boues extraites. L'injection d'aluminium pour le contrôle du foisonnement n'engendre pas d'augmentation importante de la concentration en aluminium dans l'effluent et donc dans le milieu récepteur. Par contre, la concentration en aluminium dans les boues extraites est quasiment multipliée par 10. Une attention particulière devra donc être portée au devenir des boues notamment si elles sont destinées à l'épandage. Le fer est par contre moins attaché à la matière particulaire et au moins 35 % du fer entrant (dosage et influent) est présent dans l'effluent.

### **IV.2.2. Analyse des données de fonctionnement du pilote**

#### ***IV.2.2.1. Distribution des débits***

Le débit d'alimentation ( $Q_{Alim}$ ) est asservi aux variations de conductivité comme décrit au paragraphe II.2.1 afin de simuler les temps de pluie. Les variations de ce débit d'alimentation ainsi que de la conductivité des eaux brutes sont présentées sur la Figure IV-9.



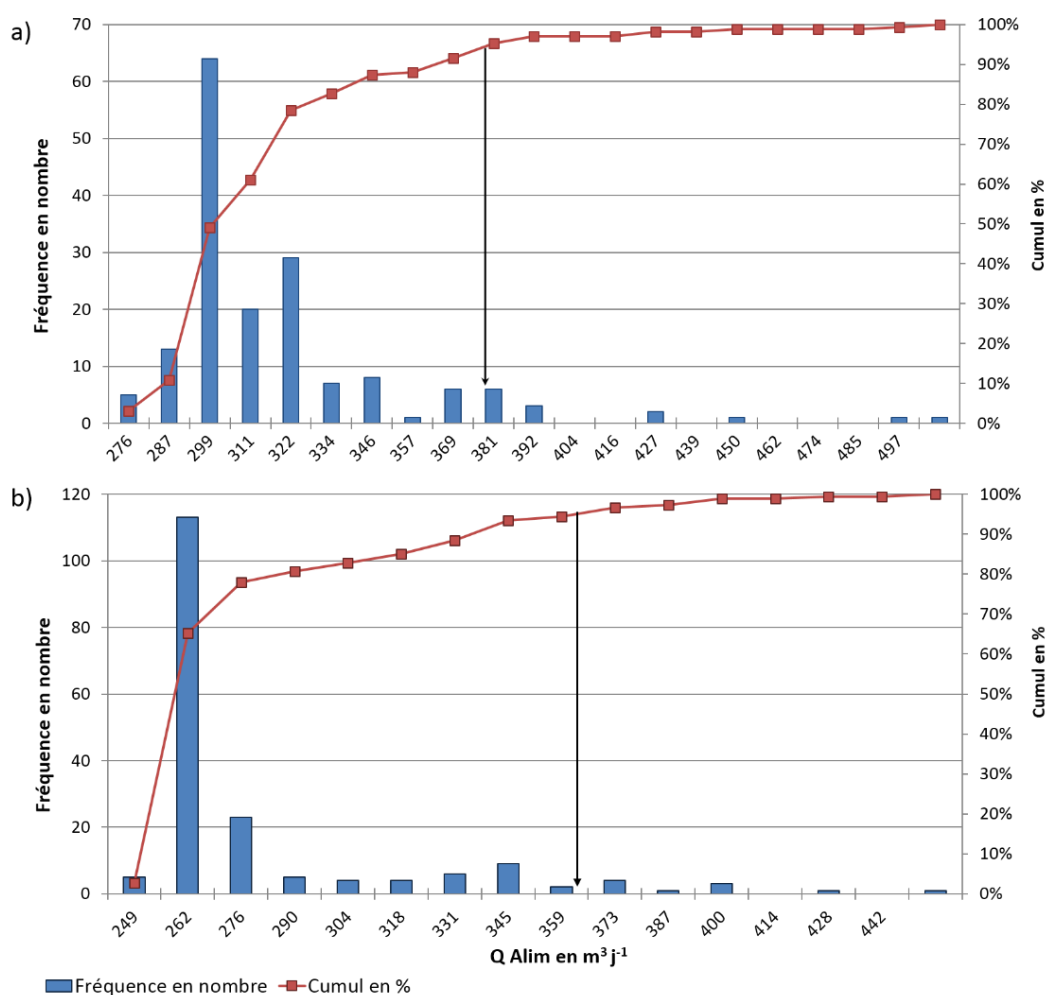
**Figure IV-9 : Variations du débit d'alimentation et de la conductivité des eaux brutes –  
a) suivi  $AlCl_3$  – b) suivi  $Al-Fe-Cl_3$**

Pour le suivi  $AlCl_3$ , une dérive du débit d'alimentation de référence, correspondant par défaut à un débit de temps sec, a été observée. Des jours 0 à 89, il était en moyenne de  $287 \text{ m}^3 \text{ j}^{-1}$ , puis de  $295 \text{ m}^3 \text{ j}^{-1}$  des jours 90 à 112, et de  $311 \text{ m}^3 \text{ j}^{-1}$  des jours 113 à 180. D'après les exploitants, cette dérive ferait suite à une modification du débit de référence sur l'automate due à des dysfonctionnements survenus sur la supervision.

A noter que le débit a été augmenté des jours 34 à 39 alors qu'aucune pluie n'était observée. Cette augmentation était liée à un encrassement du conductimètre, et a conduit à une surcharge hydraulique et organique significative du pilote durant 4 jours.

Pour le suivi  $Al-Fe-Cl_3$ , le débit moyen par temps sec était stable à une valeur de  $260 \text{ m}^3 \text{ j}^{-1}$ . Les temps de pluie ont été moins fréquents et ont été globalement regroupés en trois périodes, des jours 4 à 59, 79 à 95 et 154 à 174.

La distribution des volumes journaliers est présentée sur la Figure IV-10 pour les deux suivis. Cette représentation permet de différencier les temps secs des temps de pluie, afin d'étudier les différences potentielles de composition des eaux usées en fonction de la pluviométrie.



Les débits les plus fréquents sont compris entre  $287 \text{ m}^3 \text{ j}^{-1}$  et  $322 \text{ m}^3 \text{ j}^{-1}$  pour le suivi  $AlCl_3$ . Par temps sec, le débit moyen est de  $299 \text{ m}^3 \text{ j}^{-1}$ . Le débit nominal étant de  $264 \text{ m}^3 \text{ j}^{-1}$ , le pilote a donc fonctionné par temps sec à 113 % de sa capacité nominale. Pour le suivi  $Al-Fe-Cl_3$ , le pilote a globalement fonctionné à son débit nominal avec un débit moyen de  $262 \text{ m}^3 \text{ j}^{-1}$ . Les débits les plus fréquents étaient compris entre  $262 \text{ m}^3 \text{ j}^{-1}$  et  $276 \text{ m}^3 \text{ j}^{-1}$ .

La fréquence du débit cumulé indique que 95 % du temps, le débit d'alimentation était inférieur à  $381 \text{ m}^3 \text{ j}^{-1}$  pour le suivi  $AlCl_3$  et à  $365 \text{ m}^3 \text{ j}^{-1}$  pour le suivi  $Al-Fe-Cl_3$ . Les débits supérieurs à  $320 \text{ m}^3 \text{ j}^{-1}$  pour le suivi  $AlCl_3$  et à  $275 \text{ m}^3 \text{ j}^{-1}$  pour le suivi  $Al-Fe-Cl_3$  coïncidant avec une conductivité inférieure à  $1400 \mu\text{S cm}^{-1}$  ont été considérés comme correspondant à des temps de pluie.

Les débits reçus par le pilote ont été légèrement plus importants pour le suivi  $AlCl_3$  que pour le suivi  $Al-Fe-Cl_3$ , certainement dû à la dérive du débit de référence et aux temps de pluie plus fréquents bien que de plus courte durée.

### IV.2.2.2. Ratios caractéristiques

Les ratios caractéristiques de l'influent avant (ERU) et après décantation primaire (ED) ainsi que les valeurs usuelles d'une eau résiduaire urbaine avant (Stricker and Heduit 2010) et après décantation primaire (Hauduc 2010) sont synthétisés dans le Tableau IV-6.

**Tableau IV-4 : Ratios caractéristiques des eaux résiduaires reçues par le pilote en entrée (ERU) et après décantation primaire (ED) pour les deux suivis – valeurs moyennes**

	DCO <sub>t</sub> /DBO <sub>5</sub>	MES/DCO <sub>t</sub>	N-NH <sub>4</sub> /NTK	DCO <sub>t</sub> /NTK	DCO <sub>t</sub> /P <sub>t</sub>
PILBIO ERU - Suivi AlCl <sub>3</sub>	2,59	0,53	0,68	7,8	71
PILBIO ERU – Suivi Al-Fe-Cl <sub>3</sub>	2,47	0,61	0,71	7,7	65
Valeurs usuelles en France *	2,42	0,52	0,68	9,7	69
PILBIO ED - Suivi AlCl <sub>3</sub>	2,50	0,41	0,72	6,2	61
PILBIO ED – Suivi Al-Fe-Cl <sub>3</sub>	2,43	0,48	0,75	6,5	59
Valeurs usuelles Européennes **	1,85	0,34	0,75	8,1	44

\* (Stricker and Heduit 2010) \*\* (Hauduc 2010)

Les eaux résiduaires reçues par le pilote ont des caractéristiques urbaines. Les ratios DCO<sub>t</sub>/P<sub>t</sub> élevés indiquent que l'influent est relativement pauvre en phosphore (compris entre 3,5 et 8,7 mg P L<sup>-1</sup>). Le ratio DCO<sub>t</sub>/NTK relativement faible, couplé à un ratio N-NH<sub>4</sub>/NTK classique, indique que l'influent est plus riche en NTK et N-NH<sub>4</sub> qu'une eau résiduaire urbaine typique. Ceci a également été noté pour l'année 2012 (suivi AlCl<sub>3</sub>) sur les mesures réalisées en entrée de la tranche 4 de la station d'épuration Seine aval.

Les ratios caractéristiques de l'influent par temps sec et temps de pluie ne sont pas significativement impactés par la pluviométrie (Annexe 9). Lors des temps de pluie, les concentrations en DCO<sub>t</sub>, MES, NTK et P<sub>t</sub> chutent respectivement de 15 %, 10 %, 23 % et 17 % pour le suivi AlCl<sub>3</sub>. Pour le suivi Al-Fe-Cl<sub>3</sub>, ces paramètres chutent dans les mêmes ordres de grandeur. L'impact du temps de pluie sur ces concentrations est faible par rapport à ce qui avait été observé en 2010 lors de l'étude de Rochais *et al.* (2010) sur ce pilote.

### IV.2.2.3. Evolution des charges journalières

Le pilote étant alimenté par un influent réel, les charges journalières reçues ne sont pas contrôlées. Les variations de la charge en DCO<sub>t</sub>, en DBO<sub>5</sub> et en MES après décantation primaire sont présentées sur la Figure IV-11.a et b et les variations de la charge en NTK et en phosphore total sur la Figure IV-11.c et d pour chaque suivi.



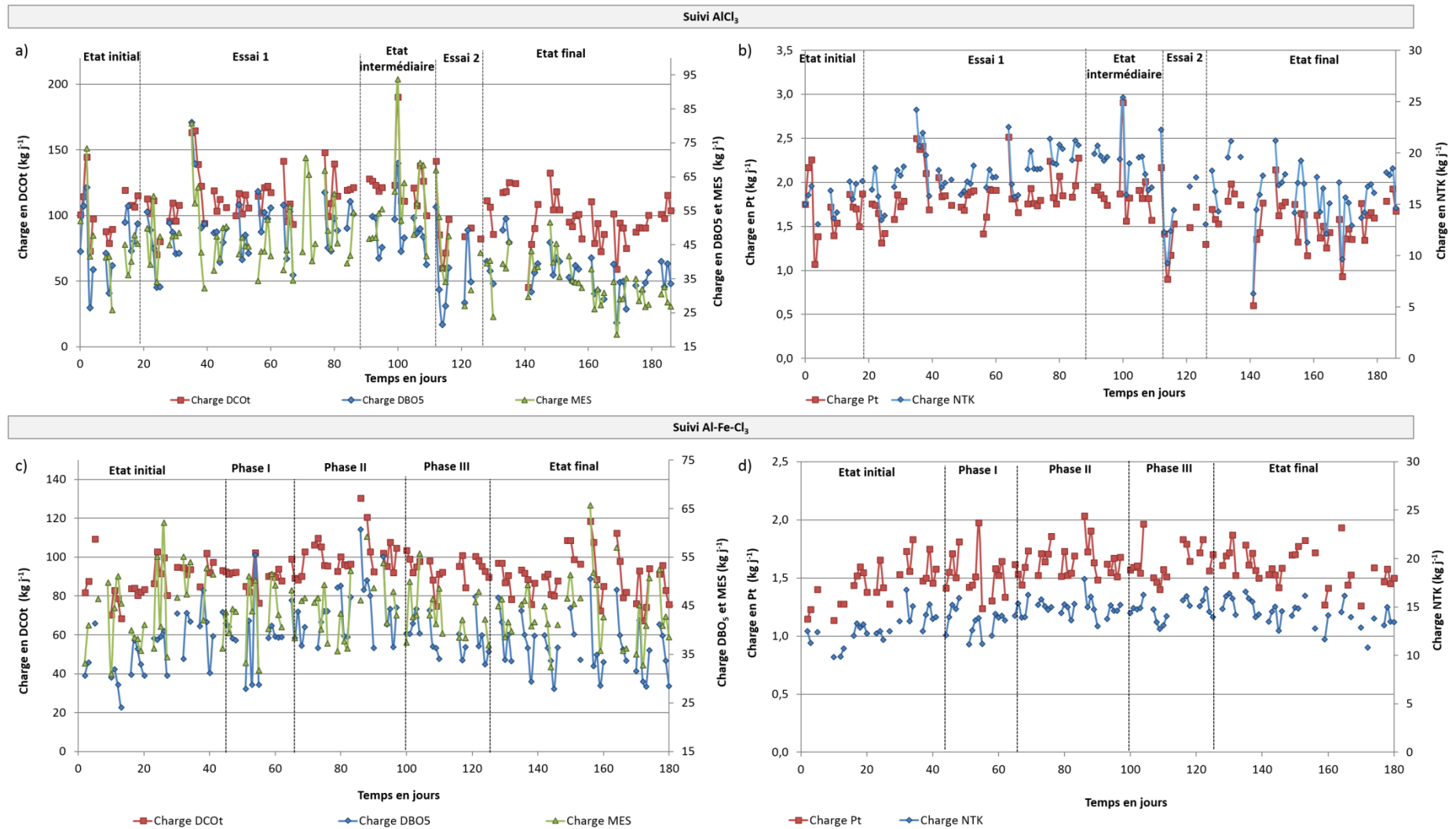


Figure IV-11 : Variation de la charge en DCOT, en MES et en  $DBO_5$  pour le suivi  $AlCl_3$  (a) et le suivi Al-Fe- $Cl_3$  (c) ainsi qu'en NTK et en Pt pour le suivi  $AlCl_3$  (b) et le suivi Al-Fe- $Cl_3$  (d)

L'étage biologique du pilote a reçu lors des trois premières phases du suivi  $\text{AlCl}_3$  une charge moyenne de  $114 \text{ kg DCO}_t \text{ j}^{-1}$ ,  $49 \text{ kg DBO}_5 \text{ j}^{-1}$  et  $49 \text{ kg MES j}^{-1}$ . Cette charge a significativement chuté avant le début de l'essai 2, de l'ordre de 30 % pour la  $\text{DCO}_t$  et la  $\text{DBO}_5$  et de 20 % pour les MES. Les variations de la charge en  $\text{P}_t$  et NTK ont suivi la même dynamique que les variations de la matière organique.

Avant le début de l'essai 2, une diminution de l'ordre de 25 % de la charge moyenne en  $\text{P}_t$  et en NTK a été observée. Des travaux ont été réalisés sur la zone de prétraitement des eaux brutes de la station Seine aval. Il est possible que les variations de charge observées soient associées à des modifications de la redistribution des eaux urbaines collectées lors des dernières étapes du suivi. De plus, d'après les mesures de conductimétrie, des temps de pluie sont survenus durant l'essai 2 alors que la simulation des temps de pluie avait été arrêtée. Ceci peut également expliquer la diminution de la charge reçue durant ces périodes.

La charge reçue par l'étage biologique lors du suivi  $\text{Al-Fe-Cl}_3$  a été légèrement plus faible que pour le suivi  $\text{AlCl}_3$ . Après une augmentation significative durant les 20 premiers jours, la charge reçue par l'étage biologique du pilote a été relativement stable sur l'ensemble du suivi, en moyenne  $92 \text{ kg DCO}_t \text{ j}^{-1}$ ,  $38 \text{ kg DBO}_5 \text{ j}^{-1}$ ,  $44 \text{ kg MES j}^{-1}$ ,  $14 \text{ kg NTK j}^{-1}$  et  $1,6 \text{ kg P}_t \text{ j}^{-1}$ .

#### IV.2.2.4. Charges journalières ramenées à l'EH

La distribution des charges ramenées à l'équivalent habitant est présentée sur la Figure IV-12 pour les deux suivis. Les charges équivalentes utilisées et rapportées dans le Tableau IV-5 sont calculées sur la base de  $60 \text{ g DBO}_5 \text{ j}^{-1}$  pour un équivalent-habitant et les ratios caractéristiques usuels des eaux résiduaires sont présentés dans le Tableau IV-4.

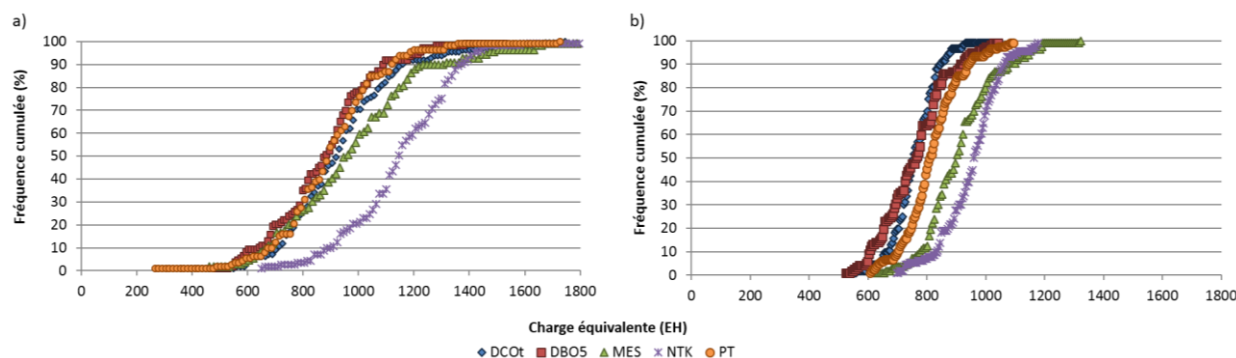


Figure IV-12 : Charges journalières ramenées à l'équivalent habitant a) suivi  $\text{AlCl}_3$  et b) suivi  $\text{Al-Fe-Cl}_3$

Tableau IV-5 : Valeurs de l'équivalent-habitant sur la base de  $60 \text{ g j}^{-1}$  de  $\text{DBO}_5$  (Stricker et Hédit, 2010)

$\text{DCO}_t$	$\text{DBO}_5$	MES	NTK	$\text{P}_t$
$\text{g j}^{-1}$	$\text{g j}^{-1}$	$\text{g j}^{-1}$	$\text{g j}^{-1}$	$\text{g j}^{-1}$
145	60	75	15	2,1

Le percentile 80 % correspond à une charge comprise entre 1 000 et 1 200 équivalents habitant pour le suivi  $\text{AlCl}_3$  sur l'ensemble des paramètres sauf pour l'azote Kjeldhal qui indique une charge de l'ordre de 1 300 EH.

La charge en équivalents-habitants reçue lors du suivi Al-Fe-Cl<sub>3</sub> a été plus faible. En effet, le percentile 80 % correspond à une charge de 800 et 900 équivalents-habitants pour l'ensemble des paramètres, sauf pour l'azote Kjeldhal et les MES, qui indiquent une charge de l'ordre de 1 000 EH. Comme indiqué précédemment, cet effluent est relativement riche en azote.

De plus, les réglages relatifs à la simulation des temps de pluie ayant été modifiés entre les deux séries de mesures, les charges reçues lors du suivi AlCl<sub>3</sub> sont comprises dans une gamme plus large que celles reçues lors du suivi Al-Fe-Cl<sub>3</sub>.

#### ***IV.2.2.5. Evolution des matières en suspension***

Les variations de la masse totale des boues dans le système en termes de MES et MVS sont présentées sur la Figure IV-13 ainsi que le flux de MES extrait lors des suivis.

- *Evolution des matières en suspension pour le suivi AlCl<sub>3</sub>*

Pour le suivi AlCl<sub>3</sub>, la masse de boues dans le système a évolué en lien avec les différentes perturbations survenues sur le pilote (Tableau II-13) et les variations de la masse en MES extraites par raclage et par l'extraction des boues (Figure V-3.a et Figure IV-13.b). Initialement les masses étaient de l'ordre de 550 kg de MES et de 420 kg de MVS. Lors de l'augmentation du flux de MES extrait (jour 21), suivie de la période de surcharge, les masses de MES et de MVS ont respectivement diminué d'environ 135 kg et 100 kg. Cette diminution a été compensée par une période d'arrêt de l'extraction des boues qui a contribué à augmenter d'un facteur 2 les masses de MES et MVS. Elles se sont ensuite stabilisées durant 16 jours (jours 70 à 86), avant de diminuer à cause d'une augmentation de la masse extraite par raclage des flottants en surface du clarificateur (Figure V-3.a).

La seconde période d'arrêt des extractions a permis d'augmenter la masse de boues dans le système pour atteindre 710 kg de MES et 551 kg de MVS au jour 113. Elle a ensuite diminué progressivement jusqu'au jour 169 où elle était de l'ordre de 376 kg de MES et de 300 kg de MVS. Cette diminution pourrait être due à la diminution de la charge entrante (Figure IV-4) et à une extraction des boues trop importante par rapport à la croissance de la biomasse. Après diminution du débit d'extraction, de 6,6 à 4,4 m<sup>3</sup> j<sup>-1</sup> au jour 165, les masses de MES et MVS ont augmenté à nouveau.

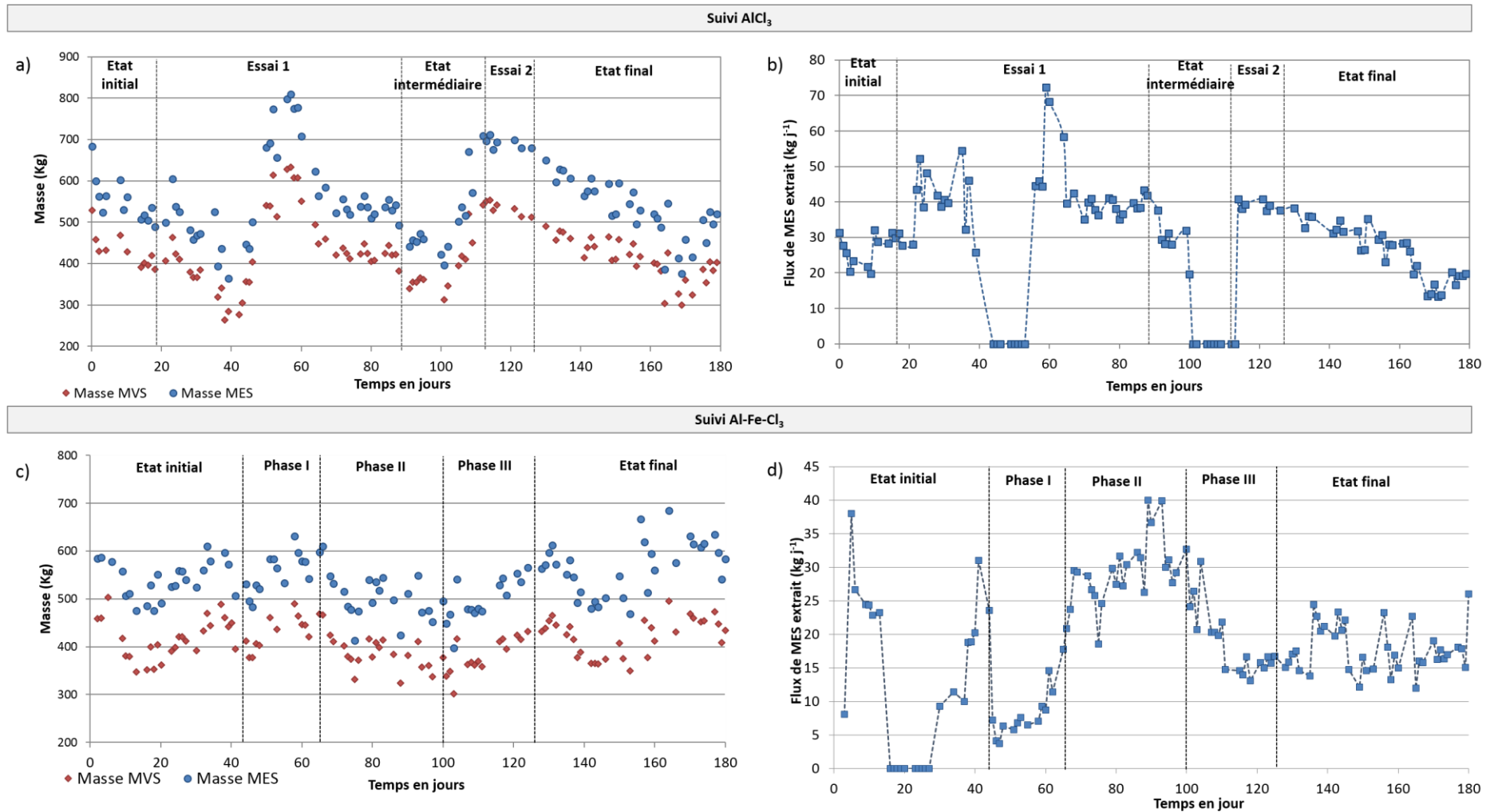


Figure IV-13 : Masse de MVS et MES dans le système (a et c) et flux en MES extrait (b et d) pour le suivi  $AlCl_3$  (a et b) et  $Al-Fe-Cl_3$  (c et d)

Le Tableau IV-6 rassemble l'ensemble des perturbations survenues sur le pilote lors du suivi  $AlCl_3$ , susceptibles d'expliquer les variations observées.

**Tableau IV-6 : Perturbations survenues lors du suivi  $AlCl_3$**

Phases du suivi	Jours	Perturbations
Essai 1 (Jours 19 à 88)	Jour 31	Arrêt du pilote durant 9h30 (absence d'aération et d'agitation)
	Jours 34 à 39	Surcharge hydraulique de 134 % par rapport au débit nominal causée par l'encrassement de la sonde de conductivité ayant conduit à un temps de pluie erroné
	Jour 52	Maintenance du système d'aération sur le bassin C2 – vidange du bassin.
	Jours 43 à 55	Arrêt de l'extraction
État intermédiaire (Jours 89 à 112)	Jours 101 à 113	Arrêt de l'extraction
Essai 2 (Jours 113 à 126)	Jour 112	Arrêt du mode « temps de pluie »
	Jours 117 à 119	Coupage de l'alimentation du pilote sur une durée indéterminée suite à une coupure d'électricité sur le site
État final (Jours 127 à 179)	Jours 127 à 128	Coupage de l'alimentation du pilote durant quelques heures suite à une coupure d'électricité sur le site
	Jour 129	Maintenance supprimeur : arrêt du pilote durant 4h30
	Jours 138 à 140	Coupage de l'alimentation du pilote sur une durée indéterminée suite à une coupure d'électricité sur le site
	Jour 151	Remise en route de la simulation des « temps de pluie »

- Évolution des matières en suspensions pour le suivi  $Al-Fe-Cl_3$

Le fonctionnement du pilote en termes de masse de boues dans le système a été globalement plus stable que lors du suivi  $AlCl_3$ . La masse de boues dans le système lors du suivi a subi des variations de plus ou moins 145 kg autour d'une valeur moyenne de 540 kg en MES.

Lors des deux premières phases du suivi, les variations de la masse des matières en suspensions peuvent être liées aux difficultés à maintenir un taux de boues stable dans le système, dues aux flottants au niveau du clarificateur (Figure V-3.c). Pour compenser ces pertes de boues, le débit d'extraction a été réduit (débit inférieur à  $2,2 \text{ m}^3 \text{ j}^{-1}$ ) voire stoppé des jours 14 à 33 puis des jours 45 à 60.

Durant les phases II et III, bien que le départ des boues ait été nettement réduit (Figure V-3.c) la masse en MVS dans le système a diminué d'environ 100 kg. Il est possible que le flux de boues extrait ait été trop important durant cette période. La diminution observée des jours 131 à 146 peut être due à une légère augmentation du volume de flottants raclés sur le clarificateur, combinée à une légère augmentation du débit d'extraction.

- Évolution de la minéralisation des boues lors de l'ajout des sels métalliques

Le suivi de l'évolution des ratios MVS/MES et MMS/MES dans les liqueurs mixtes, présentée sur la Figure IV-14, met en évidence la minéralisation des boues lors de l'ajout des sels métalliques pour les deux suivis.

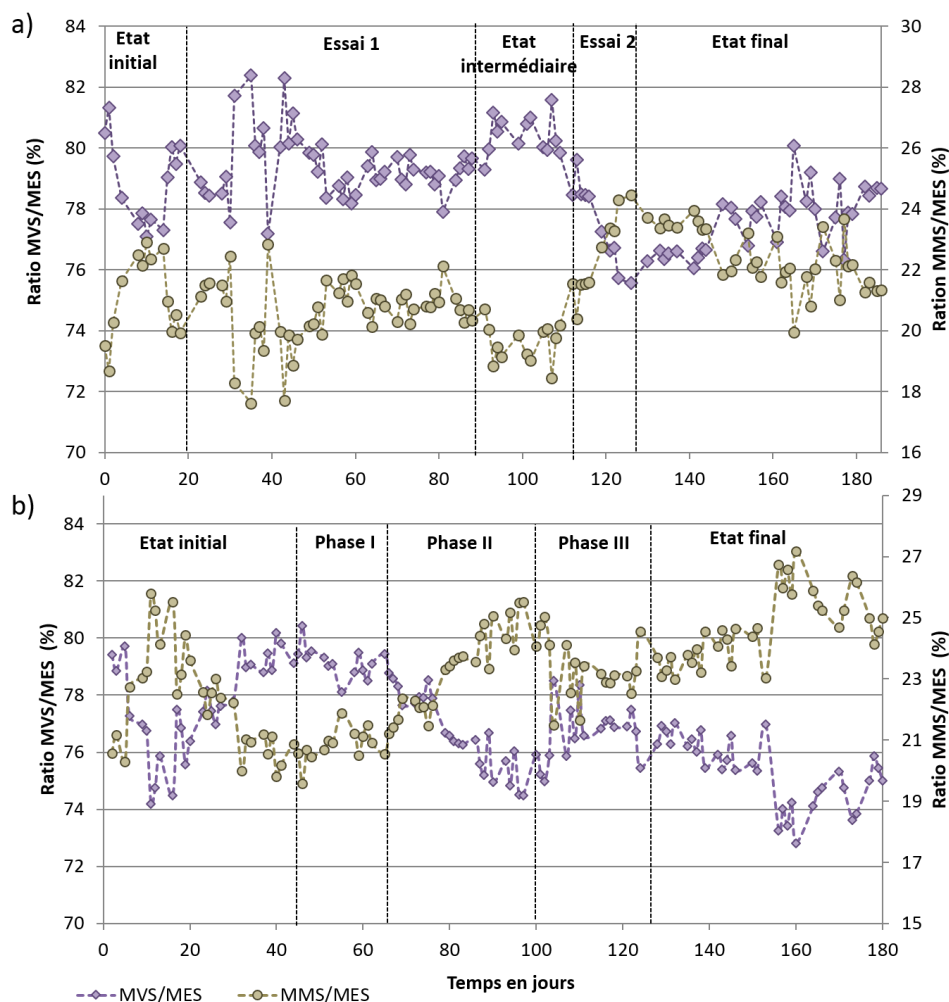


Figure IV-14 : Évolution du ratio MVS/MES et MMS/MES pour le suivi  $\text{AlCl}_3$  (a) et  $\text{Al-Fe-Cl}_3$  (b)

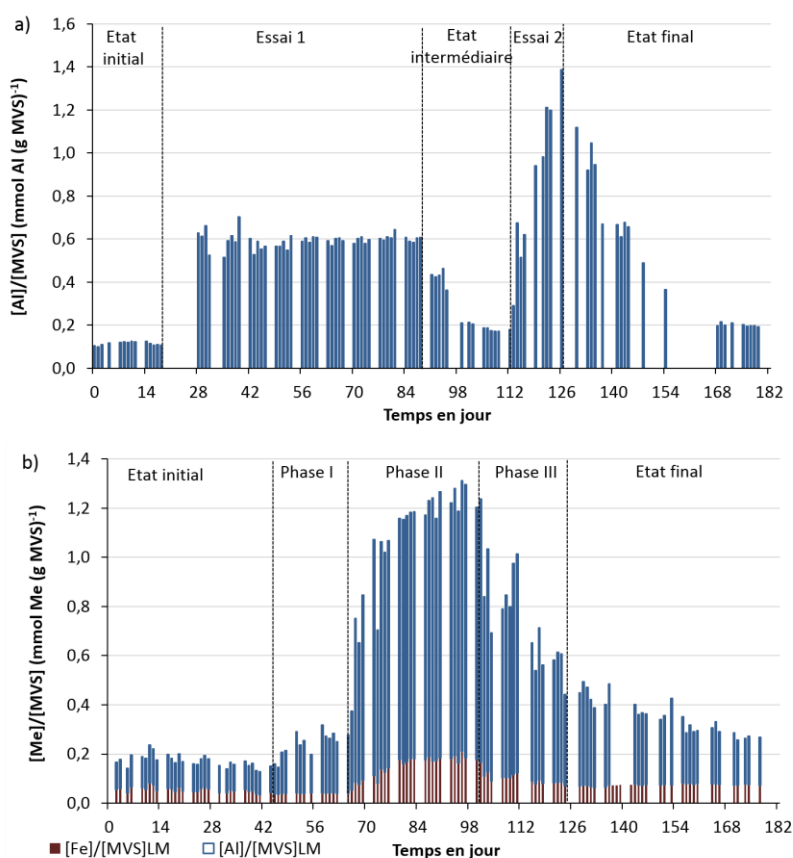
L'augmentation du ratio MVS/MES à l'état initial pour les deux suivis reflète une minéralisation des boues probablement due à un temps de pluie. Le ratio moyen était de l'ordre de 0,78 pour les deux suivis.

Le ratio a peu évolué durant l'essai 1 et l'état intermédiaire lors du suivi  $\text{AlCl}_3$  ainsi que lors de la phase I du suivi  $\text{Al-Fe-Cl}_3$ . Par contre, il a nettement diminué lors de l'augmentation du dosage en phase II lors du suivi  $\text{Al-Fe-Cl}_3$  et lors de l'essai 2 du suivi  $\text{AlCl}_3$ . Il a atteint un minimum de 0,76 durant l'essai 2 et de 0,74 en phase II. L'ajout des sels métalliques a contribué à la minéralisation des boues avec une fraction minérale de l'ordre de 25 %. Sur des stations réalisant un traitement physico-chimique du phosphore, le taux de MVS peut être beaucoup plus bas, de l'ordre de 60 % (FNDAE n°29), la fraction de MVS reste donc élevée pour la présente étude.

Il peut être noté une forte minéralisation des boues à partir du jour 156 pour le suivi Al-Fe-Cl<sub>3</sub>. Ceci peut être un effet concomitant du temps de pluie et de l'augmentation de la concentration en sels de fer dans l'influent (en moyenne 1,3 mg L<sup>-1</sup> sur cette période au lieu de 0,65 mg L<sup>-1</sup> en moyenne pour l'ensemble du suivi).

- Évolution de la concentration en aluminium et en fer par rapport à la concentration en MVS dans les liqueurs mixtes

L'évolution de la concentration en aluminium et en fer estimée par rapport à la concentration en MVS dans les liqueurs mixtes est représentée sur le Figure IV-15 pour le suivi AlCl<sub>3</sub> et le suivi Al-Fe-Cl<sub>3</sub>.



**Figure IV-15 : Concentration en aluminium et en fer rapportée à la concentration en MVS dans les liqueurs mixtes pour le suivi AlCl<sub>3</sub> (a) et Al-Fe-Cl<sub>3</sub> (b)**

Au cours du suivi Al-Fe-Cl<sub>3</sub>, la concentration en sels métalliques a atteint des valeurs comprises entre 1,1 et 1,3 mmol Me (g MVS)<sup>-1</sup> soit 0,9 et 1,2 mmol Al (g MVS)<sup>-1</sup> durant 30 jours. Lors du suivi AlCl<sub>3</sub>, la concentration en aluminium atteinte lors de l'essai 2 a été légèrement plus élevée (0,9 mmol Al (g MVS)<sup>-1</sup> à 1,4 mmol Al (g MVS)<sup>-1</sup>) mais sur une période plus courte (7 jours). Les concentrations maximales atteintes dans les liqueurs mixtes par rapport à la concentration en MVS dans les bassins sont comparables entre les deux suivis mais les temps d'exposition sont bien différents.

#### IV.2.2.6. Charge massique et âge de boues

La charge massique et l'âge de boues du système ont été calculés pour les différentes étapes des deux suivis suivant les équations décrites au paragraphe II.3.3. Les résultats sont présentés dans le Tableau IV-7 pour le suivi  $\text{AlCl}_3$  et dans Tableau IV-8 pour le suivi  $\text{Al-Fe-Cl}_3$ .

**Tableau IV-7 : Charges massiques et âges de boues pour les différentes périodes du suivi  $\text{AlCl}_3$**

	État initial Jours 0 à 18	Essai 1 Jours 19 à 88	État intermédiaire Jours 89 à 112	Essai 2 Jours 113 à 126	État Final Jours 127 à 180
Charge massique ( $\text{kg DBO}_5 (\text{kg MVS})^{-1} \text{ j}^{-1}$ )	0,11 (0,09 – 0,14)	0,12 (0,08 – 0,24)	0,13 (0,09 – 0,16)	0,06 (0,04 – 0,09)	0,09 (0,07 – 0,11)
Âge de boues (j)	12	11	11	17	14

La période de surcharge des jours 35 à 39 a provoqué une augmentation de la charge massique. Ensuite, elle a diminué dès le jour 101 avec l'arrêt de l'extraction de boues puis la diminution de la charge entrante (paragraphe IV.2.2.3). La semaine précédant l'essai 2 (jours 105 à 109), elle était en moyenne à  $0,11 \text{ kg DBO}_5 (\text{kg MVS})^{-1} \text{ j}^{-1}$  avant de diminuer rapidement lors de la première semaine de cet essai (jours 112 à 116) et d'atteindre la valeur moyenne de  $0,06 \text{ kg DBO}_5 (\text{kg MVS})^{-1} \text{ j}^{-1}$  et de  $0,07 \text{ kg DBO}_5 (\text{kg MVS})^{-1} \text{ j}^{-1}$  la semaine suivante (jours 119 à 123).

**Tableau IV-8 : Charges massiques et âges de boues moyen pour les différentes périodes du suivi  $\text{Al-Fe-Cl}_3$**

	État initial Jours 0 à 44	Phase I Jours 45 à 65	Phase II Jours 66 à 100	Phase III Jours 101 à 125	État Final Jours 126 à 180
Charge massique ( $\text{kg DBO}_5 (\text{kg MVS})^{-1} \text{ j}^{-1}$ )	0,09 (0,07 – 0,11)	0,09 (0,06 – 0,11)	0,11 (0,08 – 0,16)	0,10 (0,08 – 0,15)	0,09 (0,06 – 0,11)
Âge de boues (j)	13	14	12	17	17

La charge massique était globalement stable, autour de  $0,1 \text{ kg DBO}_5 (\text{kg MVS})^{-1} \text{ j}^{-1}$ . L'âge de boues était également stable pour les trois premières phases du suivi avant d'augmenter de cinq jours lors des deux dernières phases, bien que la charge massique ait peu évolué.

#### IV.2.3. Modélisation du fonctionnement du pilote pour le suivi $\text{AlCl}_3$

Au cours du suivi  $\text{AlCl}_3$ , le pilote a été sujet à de nombreuses perturbations. Afin de faciliter l'interprétation des données, une modélisation du système biologique a été réalisée en utilisant le modèle ASM3+BioP (Rieger *et al.* 2001).



#### IV.2.3.1. Initialisation du modèle

L'initialisation du modèle a été réalisée à partir des données de l'état initial. Les boues racless ont été ajoutées à la masse de boues extraite par jour pour déterminer le flux total de boues extraites du système (Équation IV-3) :

$$Q_{Ext,M} = Q_{Ext,P} + \frac{[MES]_{RCL} \times Q_{RCL}}{[MES]_{Ext,P}}$$

**Équation IV-3**

Avec :

$Q_{Ext,M}$  : débit d'extraction pour la modélisation ( $m^3 j^{-1}$ ) ;

$Q_{Ext,P}$  : volume des boues racless ( $m^3 j^{-1}$ ) ;

$[MES]_{RCL}$  : concentration en MES dans les boues racless ;

$[MES]_{Ext,P}$  : concentration en MES dans les boues extraites.

5 % de l'azote Kjeldahl en entrée de l'étage biologique du pilote a été considéré comme inerte au traitement biologique. Le clarificateur a été considéré comme idéal et les MES dans l'effluent ont été calculées en appliquant la fraction  $[MES]_{Eff}/[MES]_{LM}$  mesurée.

#### IV.2.3.2. Fractionnement

Le schéma du fractionnement de la DCO totale sur l'influent appliqué par SIMBA est donné en Annexe 10. Les valeurs de fractionnement utilisées sont décrites dans le Tableau IV-9.

**Tableau IV-9 : Paramètres de fractionnement de la DCO**

Ratio	DCO/MVS : 2,1	MES/DCO : 0,45	MMS/MES : 0,21
Fractionnement final de la DCO			
Si	5 %	Xs	47 %
Xi	16 %	Xhe	0,8 %
Ss	32 %	Xs + Ss	78 %

Si : fraction de la DCO soluble inerte – Xi : fraction de la DCO particulaire inerte – Ss : fraction de la DCO soluble rapidement biodégradable – Xs : fraction de la DCO particulaire – Xhe : fraction de la DCO correspondant à la biomasse hétérotrophe.

Le fractionnement de la DCO est cohérent avec les valeurs de la littérature (Rieger *et al.* 2001; Casellas 2002; Gillot and Choubert 2010) et au fait qu'il s'agisse d'un influent après décantation primaire.

#### IV.2.3.2.1. Calage et validation du modèle : production de boues

Conformément à la procédure proposée par Rieger *et al.* (2013), une simulation a d'abord été réalisée sur 100 jours en régime stationnaire. Les résultats obtenus en termes de MES et MVS sont résumés dans le Tableau IV-10.

Tableau IV-10 : Résultats de la simulation à l'état stationnaire

Nature du paramètre	Valeur moyenne du paramètre mesuré	Valeur moyenne du paramètre modélisé	Ecart entre les valeurs (%)
[MES] liqueurs mixtes	2197	2308	5,0
[MVS] liqueurs mixtes	1731	1745	0,5
[MVS]/[MES] liqueurs mixtes	0,787	0,77	3,9
[MES] recirculées	5020	4939	1,3
[MVS] recirculées	3946	3946	2,6

Les résultats en régime stationnaire étant satisfaisants, les simulations ont été réalisées en régime dynamique. Les concentrations en MES et MVS en sortie du bassin C3 (point de prélèvement pour les analyses) simulées et observées expérimentalement sont décrites sur la Figure IV-16.

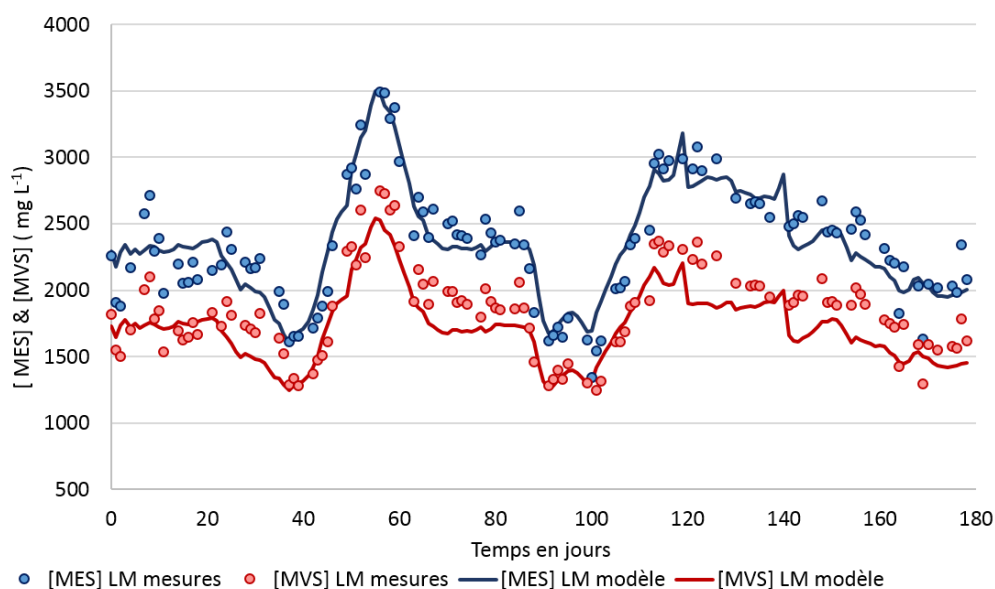


Figure IV-16 : Concentrations en MES et MVS mesurées et modélisées dans les liqueurs mixtes (LM)

L'écart entre les valeurs modélisées et mesurées est en moyenne de 6,8 % pour les MES, de 9,2 % pour les MVS et de 6,7 % pour le ratio MVS/MES. Les simulations permettent donc bien de représenter l'évolution des matières en suspension observée sur le pilote.

#### IV.2.3.2.2. Calage et validation du modèle : nitrification – dénitrification

Afin de caler et de valider la simulation de la nitrification et de la dénitrification de l'azote, les concentrations en N-NH<sub>4</sub> (S<sub>NH</sub>) et en N-NO<sub>x</sub> (S<sub>NO</sub>) de l'effluent ont été comparées à celles mesurées sur le pilote. Les résultats sont décrits sur la Figure IV-17.

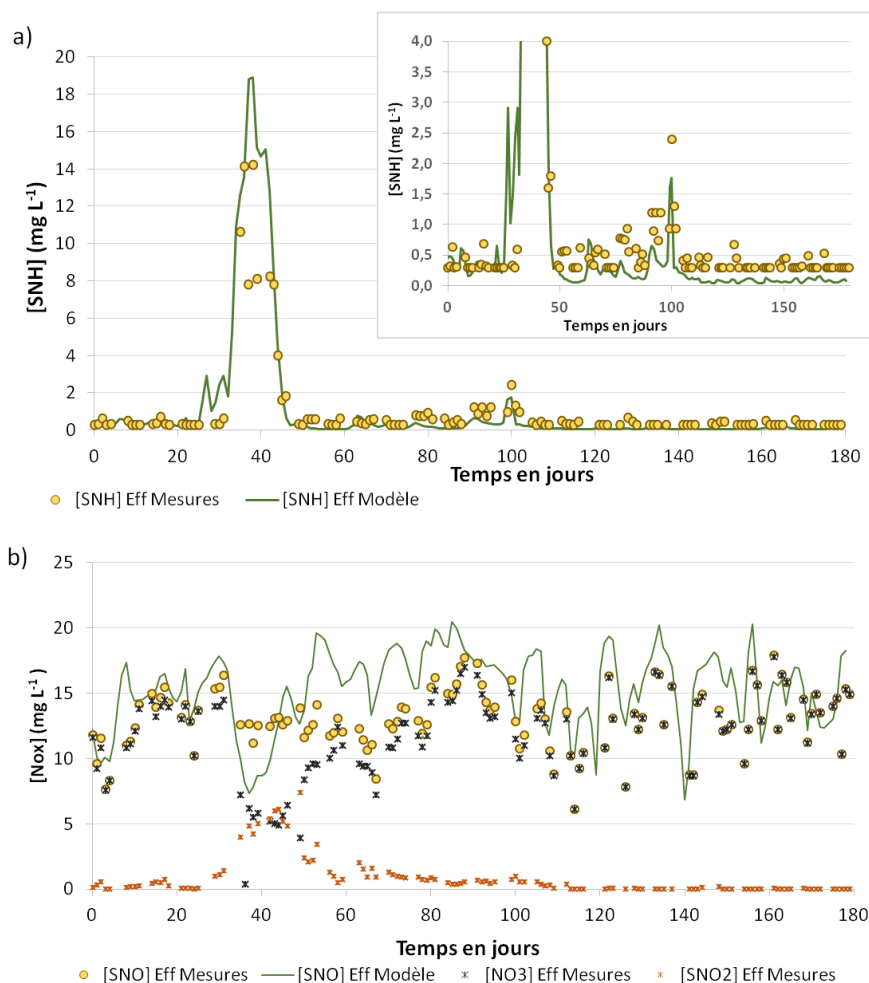


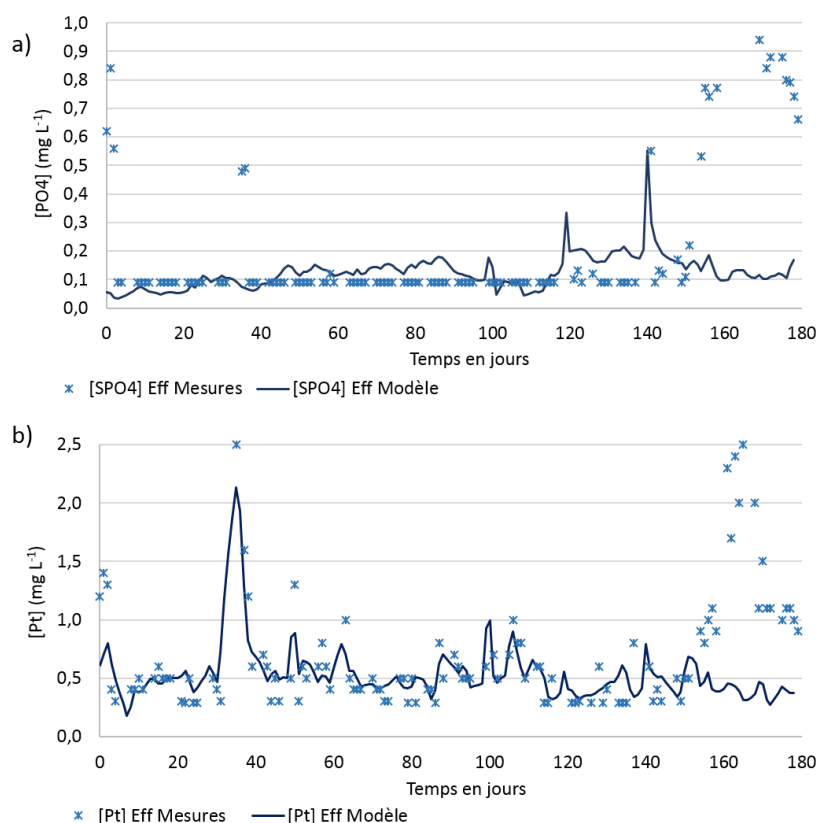
Figure IV-17 : Evolution des concentrations en  $NH_4$  (a) et  $NO_x$  (b) mesurées et modélisées dans l'effluent

La modélisation de la nitrification est satisfaisante avec un écart entre les concentrations en ammonium mesurées et simulées de l'ordre de  $0,6\ mg\ L^{-1}$ , bien que ponctuellement, au moment de la surcharge, l'écart soit de  $11\ mg\ L^{-1}$ .

La modélisation des formes oxydées de l'azote est moins satisfaisante avec un écart moyen entre les concentrations de  $3,1\ mg\ L^{-1}$ . Ceci est dû au fait que la nitrification n'est modélisée qu'en une seule étape. La production et la consommation des nitrites ne sont par conséquent pas représentées par le modèle. Afin de mieux représenter ces processus, il aurait été possible de les dissocier. N'étant pas l'objectif de l'étude, ceci n'a pas été réalisé.

#### IV.2.3.2.3. Calage et validation du modèle : déphosphatation

Afin de caler et de valider la simulation de la déphosphatation, les concentrations en  $P_t$  et en  $P-PO_4$  ( $S_{PO4}$ ) de l'effluent ont été comparées à celles mesurées sur le pilote. Les résultats sont présentés sur la Figure IV-18.



**Figure IV-18 : Evolution des concentrations en  $PO_4$  (a) et  $P_t$  (b) mesurées et modélisées dans l'effluent**

La modélisation des orthophosphates ( $S_{PO_4}$ ) et du phosphore total ( $P_t$ ) dans l'effluent a été jugée satisfaisante avec un écart entre les concentrations simulées et observées de l'ordre de  $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ . Cependant, la fuite en orthophosphates et  $P_t$  survenue entre les jours 154 et 176 n'est pas correctement modélisée. Ceci peut être dû au fait que la compétition entre la déphosphatation biologique et physico-chimique est encore mal représentée en modélisation, et à l'effet des temps de pluie survenus pendant cette période sur le fractionnement de la matière organique. Cet effet potentiel n'a en effet pas été pris en compte dans la modélisation.

#### IV.2.3.2.4. Calage et validation du modèle : aluminium

La concentration en aluminium étant un élément d'intérêt pour le suivi, elle a été calculée à partir des masses en  $\text{AlPO}_4$  et  $\text{Al}(\text{OH})_4$  simulées. Les résultats sont représentés sur la Figure IV-19.

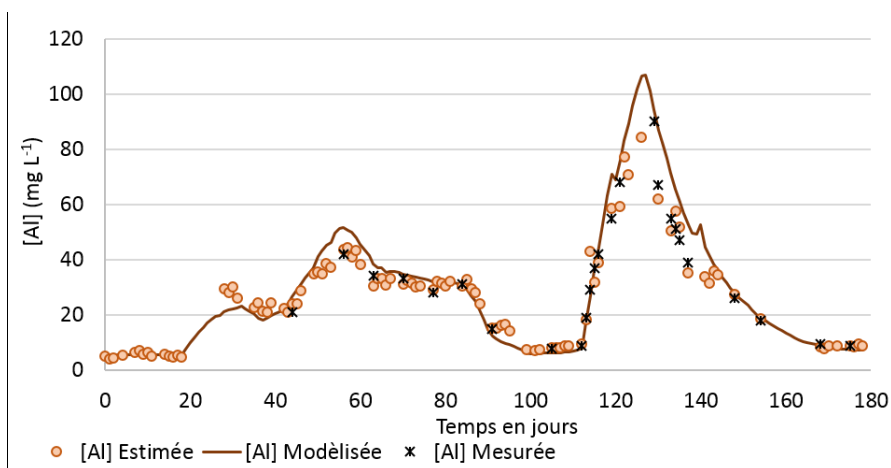


Figure IV-19 : Concentrations en aluminium mesurées, estimées et modélisées dans les liqueurs mixtes

Le modèle représente globalement bien les tendances évolutives des concentrations en aluminium mesurées malgré un écart moyen de l'ordre de 15 %. Cet écart pourrait être lié aux hypothèses simplificatrices du modèle quant aux précipités formés lors de l'ajout de sels métalliques.

#### IV.2.4. Conclusions

L'analyse du fonctionnement du pilote a nécessité l'application systématique d'une procédure de consolidation des données. Celle-ci a permis d'identifier d'éventuelles valeurs aberrantes et de les écarter des jeux de données finaux. Les données consolidées ont pu ensuite être utilisées pour caractériser le fonctionnement du pilote, en termes d'évolution des masses de boues notamment. Les performances épuratoires du pilote, en lien avec l'ajout de sels métalliques, seront analysées dans le détail dans le chapitre suivant.

Le fonctionnement lors du suivi  $\text{AlCl}_3$  ayant été particulièrement dynamique, l'analyse des évolutions des masses de boues a nécessité le recours à la modélisation. Un modèle biocinétique de fonctionnement du pilote a été calé et validé pour cette période. Il permettra également d'aider l'analyse de l'impact des sels métalliques ajoutés.

### IV.3. Interprétation des résultats obtenus en PCR quantitative

L'impact des sels métalliques sur les populations bactériennes des boues activées a été étudié par PCR en temps réel, en quantifiant certaines populations d'intérêt tout au long des deux suivis réalisés. Cette méthode requiert plusieurs étapes, décrites sur la Figure IV-20, qui induisent autant d'incertitudes sur les valeurs obtenues. Il est nécessaire de les estimer afin d'une part, de connaître la significativité des variations de populations observées, et d'autre part, de choisir la façon de présenter les résultats qui soit la plus représentative de l'évolution réelle des populations dans les liqueurs mixtes.

#### IV.3.1. Variabilité due à l'extraction de l'ADN génomique

Les extractions d'ADN ont été réalisées en triplicats, sur 24 échantillons de liqueurs mixtes pour l'essai Al-Fe-Cl<sub>3</sub> et sur 37 échantillons pour les essais AlCl<sub>3</sub>. Les extractions ont été réalisées consécutivement et avec des kits d'extraction possédant le même numéro de série afin de limiter les causes de variabilité (Bushon *et al.* 2010).

La qualité de l'ADN extrait a été évaluée par spectrométrie, par le rapport de l'absorbance à 260 nm sur l'absorbance à 280 nm qui doit être dans l'idéal compris entre 1,8 et 2. Un rapport inférieur à 1,8 indique une contamination protéique, un rapport supérieur à 2 une contamination par de l'ARN.

Le Tableau IV-11 rapporte les coefficients de variation (CV) moyens calculés sur les concentrations en ADN des triplicats d'extraction ainsi que le ratio A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> moyen, la concentration moyenne en ADN et le nombre d'extractions jugées satisfaisantes ([ADN] ≥ 15 ng.µL<sup>-1</sup> et/ou 1,5 ≤ A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> ≤ 2,5).

**Tableau IV-11 : Variabilité des mesures liée à l'extraction de l'ADN**

Suivi	CV moyen <sup>a</sup> (%) ± sd <sup>b</sup>	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> moyen ± sd	Masse ADN moyen (µg) <sup>c</sup> ± sd	[ADN] moyenne (µg g <sup>-1</sup> LM) <sup>d</sup> ± sd	Nbr. d'extractions satisfaisantes /total
Suivi Al-Fe-Cl <sub>3</sub>	26 ± 16	1,86 ± 0,34	3,3 ± 1,4	0,60 ± 0,29	58/72
Série 1 AlCl <sub>3</sub>	22 ± 11	1,81 ± 0,16	3,4 ± 1,2	0,55 ± 0,21	59/63
Série 2 AlCl <sub>3</sub>	34 ± 19	1,95 ± 0,17	2,2 ± 0,9	0,43 ± 0,17	35/48

a : coefficient de variation de la concentration en ADN par gramme de culot prélevé pour l'extraction

b : sd pour écart-type

c : masse d'ADN extrait en microgrammes

d : microgrammes d'ADN élué ramené aux grammes de liqueurs mixtes prélevée

Pour le suivi Al-Fe-Cl<sub>3</sub>, 80 % des extractions ont été considérées comme satisfaisantes. Parmi les extractions exclues, 8 appartenaient aux 3 mêmes échantillons. Pour l'essai 1 AlCl<sub>3</sub>, 94 % des extractions ont été considérées comme satisfaisantes et 73 % pour l'essai 2. Parmi les extractions exclues sur ce dernier essai, 9 correspondaient aux 3 mêmes échantillons. En excluant les extractions non satisfaisantes, le ratio A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> moyen sur les 3 suivis est compris entre 1,81 et 1,95, la qualité de l'ADN extrait est donc correcte.

Le CV des concentrations en ADN obtenues est compris entre 22 et 34 %, ce qui est assez élevé par rapport à l'étude de Dionisi *et al.* (2003) mais cohérent avec l'étude de Vishnivetskaya *et al.* (2014).

Avec le même kit d'extraction, ils ont obtenu une concentration de  $0,9 \pm 0,5 \mu\text{g}$  d'ADN extrait par gramme d'échantillon de liqueurs mixtes prélevé. De même, Guo et Zhang (2013) ont obtenu des quantités d'ADN extrait de l'ordre de  $4 \mu\text{g}$ . Ainsi, les résultats de la présente étude sont du même ordre de grandeur que les données disponibles dans la littérature.

### IV.3.2. Quantification des populations d'intérêt

Les analyses ont été réalisées en série et consécutivement afin de limiter les causes de variations (lots de produits commerciaux, conservations des échantillons, etc.). Les plaques qPCR ont été remplies à l'aide d'un robot de pipetage (EpMotion, Eppendorf) afin d'augmenter la reproductibilité des analyses.

Sur une plaque de 96 puits, 24 sont dédiés à la gamme étalon et aux témoins négatifs (NTC, No Template Control) réalisés en triplicats. Il reste donc 72 puits par plaque, correspondant à 24 échantillons (72 extractions). Le suivi  $\text{AlCl}_3$  comptant 37 échantillons, les analyses ont dû être effectuées en deux fois.

Les paramètres de quantification pour chaque espèce ciblée sont donnés dans le Tableau IV-12.

Tableau IV-12 : Synthèse des paramètres de quantification pour chaque espèce cible

	Suivi	Gamme de quantification (copies $\mu\text{L}^{-1}$ )	Efficacité (%)	$r^2$	Pente
<b>Bactéries totales</b>	Suivi Al-Fe- $\text{Cl}_3$	De $10^8$ à $10^3$	92,0	0,995	-3,530
	Essai 1 $\text{AlCl}_3$	De $10^8$ à $10^3$	90,0	0,995	-3,588
	Essai 2 $\text{AlCl}_3$	De $10^8$ à $10^3$	92,5	0,996	-3,517
<b><i>M. parvicella</i></b>	Suivi Al-Fe- $\text{Cl}_3$	De $10^8$ à $10^2$	89,5	0,994	-3,603
	Essai 1 $\text{AlCl}_3$	De $10^8$ à $10^2$	90,1	0,993	-3,584
	Essai 2 $\text{AlCl}_3$	De $10^8$ à $10^2$	92,8	0,999	-3,522
	Essais 1 et 2 $\text{AlCl}_3$	De $10^8$ à $10^2$	93,9	0,998	-3,478
<b>PAO</b>	Suivi Al-Fe- $\text{Cl}_3$	De $10^7$ à $10^2$	89,5	0,999	-3,603
	Essai 1 $\text{AlCl}_3$	De $10^7$ à $10^2$	88,0	0,999	-3,647
	Essai 2 $\text{AlCl}_3$	De $10^8$ à $10^2$	93,8	0,997	-3,481
<b>AOB</b>	Suivi Al-Fe- $\text{Cl}_3$	De $10^7$ à $10^2$	87,6	0,997	-3,661
	Essai 1 $\text{AlCl}_3$	De $10^7$ à $10^2$	88,4	0,995	-3,636
	Essai 2 $\text{AlCl}_3$	De $10^7$ à $10^2$	86,1	0,998	-3,707

Pour chaque échantillon, le nombre de copies du gène cible par  $\mu\text{L}$  est déterminé directement par le logiciel, par comparaison de la valeur du  $C_q$  (cycle de quantification) obtenue avec celles des standards de la gamme étalon. Afin de se ramener au nombre de copies du gène cible par gramme d'échantillon prélevé, sont considérés : la masse de liqueurs mixtes prélevée puis centrifugée, la masse de culot récupérée, la masse de culot utilisée pour l'extraction d'ADN, le volume d'élution ( $100 \mu\text{L}$ ) et les dilutions d'ADN nécessaires pour l'analyse en qPCR. L'ensemble de ces étapes est schématisé sur la Figure IV-20.

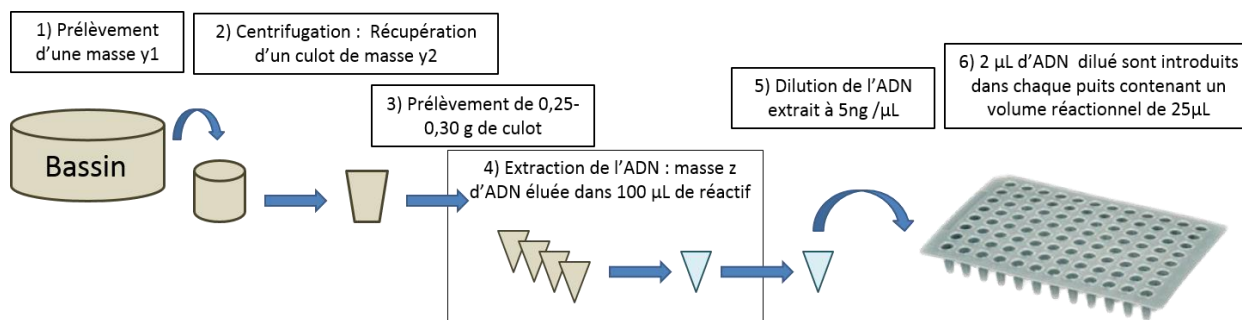


Figure IV-20 : Les différentes étapes de la quantification des gènes d'intérêt - du prélèvement à l'analyse qPCR

### IV.3.2.1. Variabilité des données de quantification

#### IV.3.2.1.1. Variabilité des données pour la gamme étalon (répétabilité intra et inter-essai)

Les variabilités intra- et inter-essais ont été évaluées sur les triplicats de chaque standard de la gamme étalon pour chaque population d'intérêt par le calcul du coefficient de variation (CV) des valeurs du cycle de quantification (Cq).

Le CV intra-essai est faible, au minimum 0,2 et au maximum 1,9 %. L'ordre de grandeur obtenu est cohérent avec l'étude de Smith *et al.* (2006) qui avaient obtenu des dispersions inférieures à 1 %, et l'étude d'Estébanes (2011) qui avait des valeurs comprises entre 0,6 et 2,7 %. Le CV inter-essais, compris entre 0,34 et 7,97 %, montre une dispersion plus importante. Une dispersion plus forte avait été constatée dans le cadre de l'étude d'Estébanes (2011), comprise entre 2,1 et 10,7 %, mais plus faible, inférieure à 2,2 %, dans l'étude de Smith *et al.* (2006).

La dispersion des valeurs du cycle de quantification est globalement faible, reflétant une bonne répétabilité intra- et inter-essais.

#### IV.3.2.1.2. Estimation de la variabilité des données pour les échantillons du pilote

Le calcul du coefficient de variation de chaque échantillon a été réalisé sur les valeurs du Cq, du nombre de copies du gène par microgramme d'ADN et par gramme d'échantillon des triplicats correspondants.

Même si les triplicats sont des triplicats techniques (1 quantification par triplicat d'extraction par échantillon) et non pas expérimentaux (3 quantifications par triplicat d'extraction par échantillon), l'ajustement des concentrations à 5 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  avant quantification permet de comparer les valeurs de Cq pour un même échantillon. Le CV obtenu est faible, compris entre 1,4 et 1,8 %, et comparable aux valeurs obtenues par Dionisi *et al.* (2003) pour des triplicats expérimentaux.

En revanche, le CV est de l'ordre de 40 % lorsque les valeurs sont exprimées en nombre de copies par gramme de boues, du fait de la prise en compte de l'efficacité de l'extraction d'ADN, variable d'un triplicat à l'autre. Ainsi, pour chaque échantillon, les valeurs de Cq trop dispersées ont été écartées. Cette consolidation des données a permis de réduire le CV jusqu'à 0,8 % sur les valeurs de Cq et de 1 à 10 % sur le nombre de copies par gramme d'échantillon.



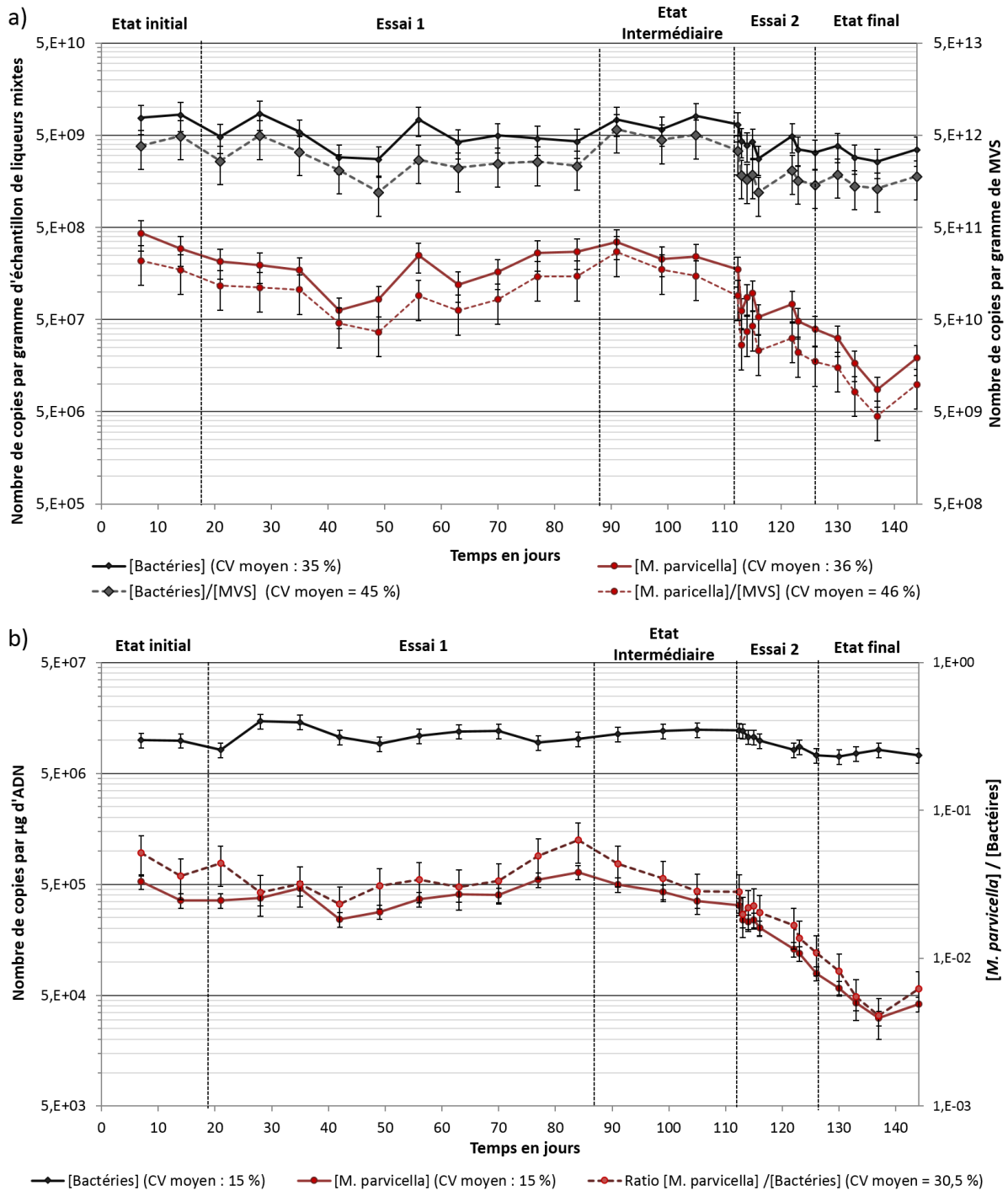
Le Tableau IV-13 reprend les valeurs de CV obtenues pour les deux suivis, après consolidation des données. Ces résultats prennent en compte, pour chaque échantillon, l'ensemble des valeurs obtenues après quantification, qu'ils aient été analysés sur une seule plaque ou sur deux plaques indépendantes (points de recouvrement - essai  $\text{AlCl}_3$ ).

**Tableau IV-13 : Estimation du coefficient de variation moyen après consolidation des données pour chaque population d'intérêt**

		CV moyen $\pm$ écart type (Nombre de données)		
		Cq	Nombre de copies ( $\mu\text{g ADN}$ ) <sup>-1</sup>	Nombre de copies (g d'échantillon) <sup>-1</sup>
Suivi $\text{AlCl}_3$	Bactéries	$1,5 \pm 0,6$ (50)	$15 \pm 10$ (50)	$35 \pm 14$ (50)
	<i>M. parvicella</i>	$1,0 \pm 0,4$ (77)	$15 \pm 9,5$ (77)	$36 \pm 17$ (77)
	PAO	$1,1 \pm 0,6$ (51)	$17 \pm 9$ (51)	$35 \pm 19$ (51)
	AOB	$1,2 \pm 0,6$ (93)	$18 \pm 10$ (59)	$31 \pm 15$ (59)
Suivi $\text{Al-Fe-Cl}_3$	Bactéries	$1,4 \pm 0,7$ (30)	$13 \pm 6,7$ (30)	$33 \pm 18$ (30)
	<i>M. parvicella</i>	$1,6 \pm 0,5$ (33)	$20 \pm 6,7$ (33)	$34 \pm 15$ (33)
	PAOs	$1,0 \pm 0,5$ (30)	$15 \pm 7,0$ (30)	$40 \pm 18$ (30)
	AOB	$1,5 \pm 0,8$ (30)	$25 \pm 12$ (30)	$33 \pm 15$ (30)

#### IV.3.2.2. Expression des résultats obtenus

Les données de quantification brutes obtenues en qPCR sont exprimées en valeurs de Cq, correspondant à une concentration en nombre de copies du gène ciblé par microlitre, attribuée par le logiciel d'analyse d'après les valeurs des standards de la gamme étalon. Ces concentrations dans le tube qPCR peuvent également être ramenées à la masse d'ADN contenue dans ce même tube, ou encore à la masse de liqueurs mixtes prélevées dans le bassin d'aération (Figure IV-20). Ces différentes expressions des résultats apportent des informations différentes mais complémentaires sur le suivi des populations d'intérêt, avec plus ou moins d'incertitudes sur les valeurs obtenues. La Figure IV-21 illustre les résultats de quantification obtenus pour *M. parvicella* et les bactéries totales pour le suivi  $\text{AlCl}_3$ .



**Figure IV-21 : Concentration (a) et proportion (b) de *M. parvicella* et des bactéries totales par qPCR – suivi AICI<sub>3</sub>**

En considérant que la densité des boues est constante et égale à celle de l'eau, le nombre de copies par gramme d'échantillon prélevé peut également être exprimé par gramme de MVS dans les liqueurs mixtes, avec toutefois une incertitude légèrement plus élevée (CV compris entre 40 et 45 %). La présentation des résultats sous cette forme présente l'avantage de pouvoir comparer les données obtenues en biologie moléculaire avec celles obtenues en modélisation.

En ce qui concerne le suivi des populations d'intérêt en termes de proportion par rapport aux bactéries totales, l'utilisation du ratio des nombres de copies par gramme d'échantillon

permet de s'affranchir mathématiquement des problèmes de répétabilité liés à l'extraction d'ADN. Cependant, les incertitudes liées à l'utilisation de ce ratio sont importantes, car elles cumulent celles dues aux quantifications des populations d'intérêt et des bactéries totales. L'utilisation des valeurs en nombres de copies par microgramme d'ADN pour chaque population d'intérêt est une alternative intéressante à l'utilisation de ce ratio. Après vérification, l'évolution du nombre de copies par microgramme d'ADN pour chaque population d'intérêt est statiquement corrélée au ratio correspondant (ex : *M. parvicella* : coefficient de Pearson = 0,96,  $p < 0,01$ ). Ainsi, l'expression des résultats en nombre de copies par  $\mu\text{g}$  d'ADN présente l'avantage de refléter l'évolution des proportions de chaque population d'intérêt tout en présentant des incertitudes de mesure nettement plus faibles.

#### IV.3.1. Conclusions

La consolidation des données de quantification a été nécessaire afin de s'assurer que les résultats représentent bien les événements survenus et ne sont pas dus à des artéfacts d'analyse. De plus, un coefficient de variation moyen a été estimé pour chaque suivi permettant ainsi de déterminer si les variations observées sont significatives, ceci étant essentiel pour l'interprétation des données en lien avec le fonctionnement du pilote.

Dans la suite du document, les données de quantification seront exprimées en nombre de copies du gène par gramme d'échantillon de liqueurs mixtes afin de suivre l'évolution de la concentration des populations d'intérêt. Leur abondance relative par rapport à l'ensemble de la biomasse, eucaryote et procaryote, sera suivie en exprimant les résultats en nombre de copies du gène par microgramme d'ADN



## **Chapitre V. Contrôle des dysfonctionnements biologiques dus à *M. parvicella* par ajout de sels métalliques**

---

## V.1. Impact des sels métalliques sur le fonctionnement du pilote

### V.1.1. Conditions de décantation et moussage

La capacité des boues à décanter, représentée par l'indice de boues (IB), a été mesurée au cours des essais ainsi que la température des liqueurs mixtes. Les distributions de l'indice de boues et de la température au cours du suivi  $\text{AlCl}_3$  et  $\text{Al-Fe-Cl}_3$  ont été confrontées et sont représentées sur la Figure V-1. Les évolutions au cours du temps de la température et de l'indice de boues sont données en Annexe 11. La variation de l'IB en fonction de la dose appliquée est également présentée sur la Figure V-2.

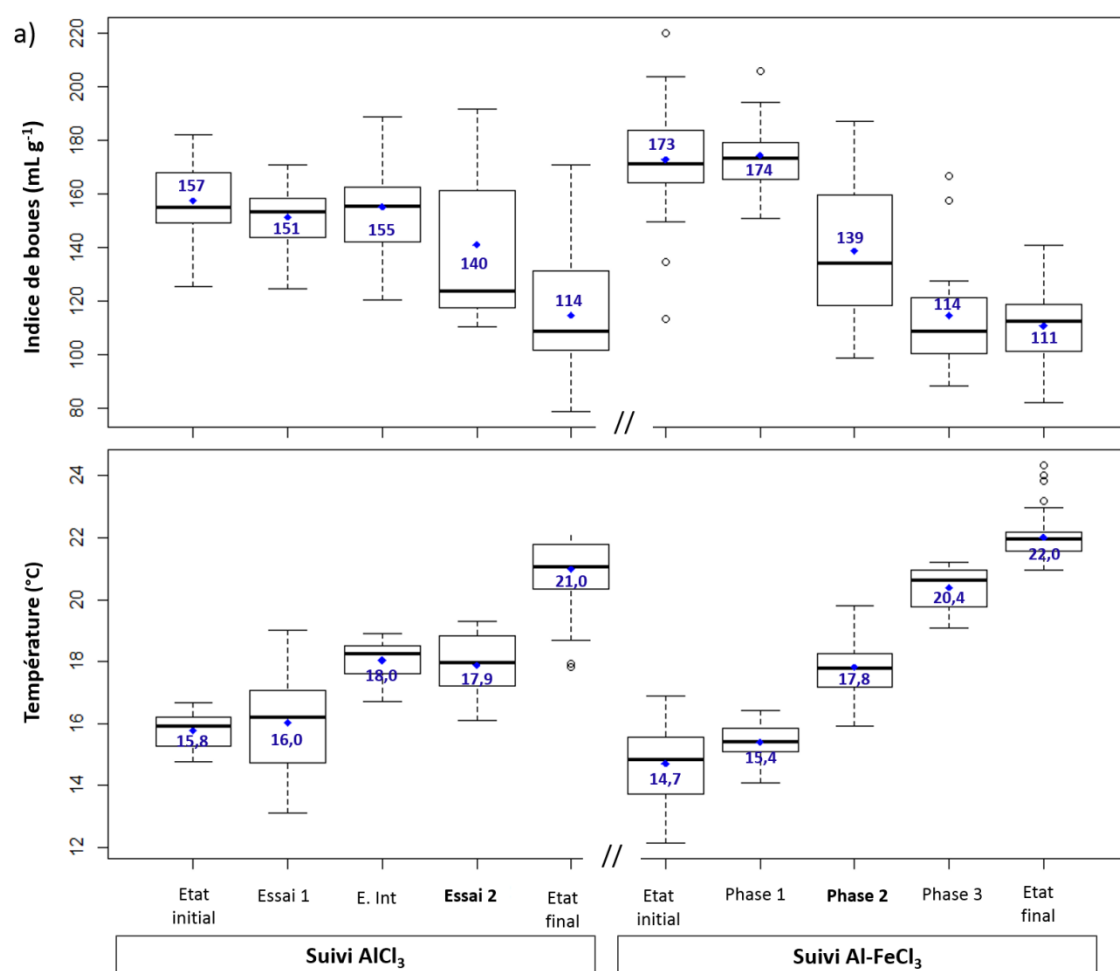
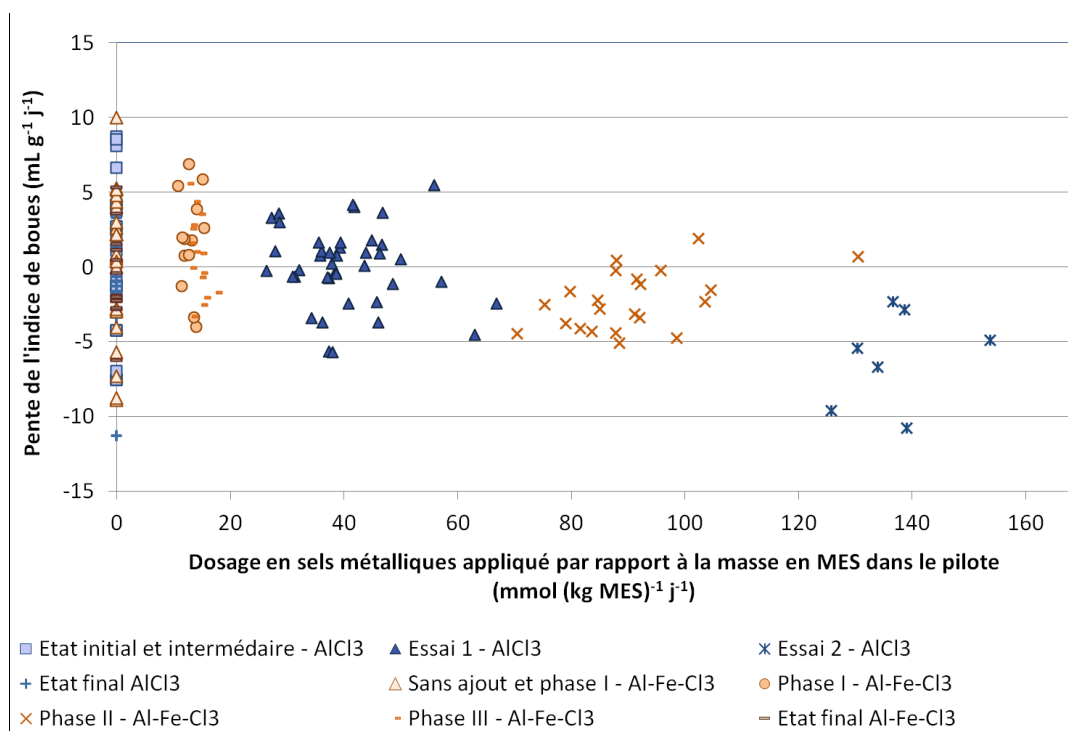


Figure V-1 : Distribution de la température sur le bassin C2 et de l'indice de boues suivant les différentes phases des suivis  $\text{AlCl}_3$  et  $\text{Al-Fe-Cl}_3$  (valeur moyenne indiquée en bleu pour chaque phase)



**Figure V-2 : Pente de l'IB calculée sur sept jours en fonction de la quantité de sels métalliques ajoutée rapportée à la masse en MES dans le système**

La semaine précédant le démarrage des essais, des mousses étaient présentes sur les bassins, la température était de l'ordre de 16°C et l'indice de boues (IB) moyen de 160 mL g<sup>-1</sup> pour le suivi AlCl<sub>3</sub> et de 202 mL g<sup>-1</sup> pour le suivi Al-Fe-Cl<sub>3</sub>. L'impact des différents ajouts est décrit dans les paragraphes suivant par ordre croissant des doses appliquées.

- Ajout de 16 mmol Me (kg MES)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> (suivi Al-Fe-Cl<sub>3</sub> phase I)

L'ajout de 16 mmol Me (kg MES)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> a entraîné une diminution progressive des mousses sur les bassins pour ne persister que sur le bassin C1. L'IB est moins dispersé et a légèrement diminué pour atteindre la valeur moyenne de 167 mL g<sup>-1</sup> la dernière semaine (Figure V-1).

- Ajout de 41 mmol Al (kg MES)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> (suivi AlCl<sub>3</sub> essai 1)

Lors de l'essai 1 du suivi AlCl<sub>3</sub>, les mousses ont disparu au bout de 11 jours de traitement, et l'IB s'est stabilisé durant 70 jours à 150 mL g<sup>-1</sup> (Figure V-1 et Figure V-2). Les températures minimales et maximales étaient respectivement de 13°C et de 18°C.

Dix jours après l'arrêt de l'essai 1, et ce malgré des températures moins favorables au foisonnement des boues induit par *M. parvicella* (17°C en moyenne), les mousses sont réapparues et les conditions de décantation se sont progressivement dégradées (Figure V-1. et Figure V-2). L'IB a atteint la valeur moyenne de 175 mL g<sup>-1</sup> la dernière semaine de l'état intermédiaire.

Ces résultats confirment l'effet positif de l'addition des sels d'aluminium à la dose de 41 mmol Al (kg MES)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> sur la stabilisation de la capacité des boues à décanter.

- Ajout de 94 mmol Me (kg MES)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> (suivi Al-Fe-Cl<sub>3</sub> phase II)

Durant la phase II du suivi Al-Fe-Cl<sub>3</sub>, l'IB a diminué globalement de 65 mL g<sup>-1</sup> en 34 jours pour des températures comprises entre 16 et 20 °C. La totalité des mousses a disparu et la charge en MES extraites par le raclage des flottants sur la clarificateur a nettement diminué (Figure V-3). L'ajout des 94 mmol Me (kg MES)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> a permis d'améliorer significativement les conditions de décantation et de diminuer la capacité des boues à mousser.

Lorsque le dosage a été réduit à la dose de 16 mmol Al (kg MES)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>, l'IB a augmenté pour atteindre en moyenne la valeur de 139 mL g<sup>-1</sup> avant de diminuer progressivement durant l'état final. Cette augmentation de l'IB après la diminution du dosage, et ce malgré des températures supérieures à 17 °C, montre bien l'efficacité des sels métalliques (Figure V-1 et Figure V-2).

- Ajout de 137 mmol Al (kg MES)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> (suivi AlCl<sub>3</sub> essai 2)

L'ajout de 137 mmol Al (kg MES)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> a conduit à une disparition des mousses en un jour (Annexe 13). L'IB a rapidement diminué notamment les trois premiers jours avec une pente comprise entre -11 et -7 mL g<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> avant d'atteindre la valeur de 111 mL g<sup>-1</sup> au jour 126 (Figure V-1 et Figure V-2). Les températures minimales et maximales étaient respectivement de 16°C et 19°C avec une moyenne de 18°C. L'ajout des sels d'aluminium à ce dosage a contribué à une amélioration significative et rapide des conditions de décantation.

Quatre semaines après l'arrêt de l'essai 2 (jour 161), l'IB a augmenté progressivement pour atteindre la valeur moyenne de 136 mL g<sup>-1</sup> les deux dernières semaines du suivi. Une fine couche de flottants a été observée à partir du jour 144 sur les bassins endogène et anoxie. Les conditions de décantation se sont progressivement dégradées.

- Synthèse

Quelle que soit la dose utilisée, l'ajout de sels métalliques réduit les phénomènes de moussage. A une dose de 16 mmol Me (kg MES)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>, les sels métalliques impactent peu l'indice de boues mais contribuent à une légère stabilisation de celui-ci. A une dose de 41 mmol Al (kg MES)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>, l'indice de boues est stabilisé autour de la valeur de 150 mL g<sup>-1</sup>.

Pour obtenir une réduction de l'indice de boues, des doses supérieures doivent être utilisées. Pour des doses de 94 mmol Me (kg MES)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> et de 137 mmol Al (kg MES)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>, l'indice de boues atteint des valeurs inférieures à 110 mL g<sup>-1</sup> d'autant plus rapidement que la dose appliquée est élevée. Pour les deux suivis, l'arrêt des ajouts conduit à une augmentation de l'indice de boues en quelques jours.

## V.1.2. Rendements d'épuration

### V.1.2.1.1. Matières en suspension

La dégradation des conditions de décantation peut entraîner des remontées de flottants en surface du clarificateur, générant des pertes de MES dans l'effluent. Dans le cas du pilote, ces flottants ont été raclés et quantifiés. Les flux de MES correspondant ainsi que ceux de l'effluent sont représentés sur la Figure V-3.



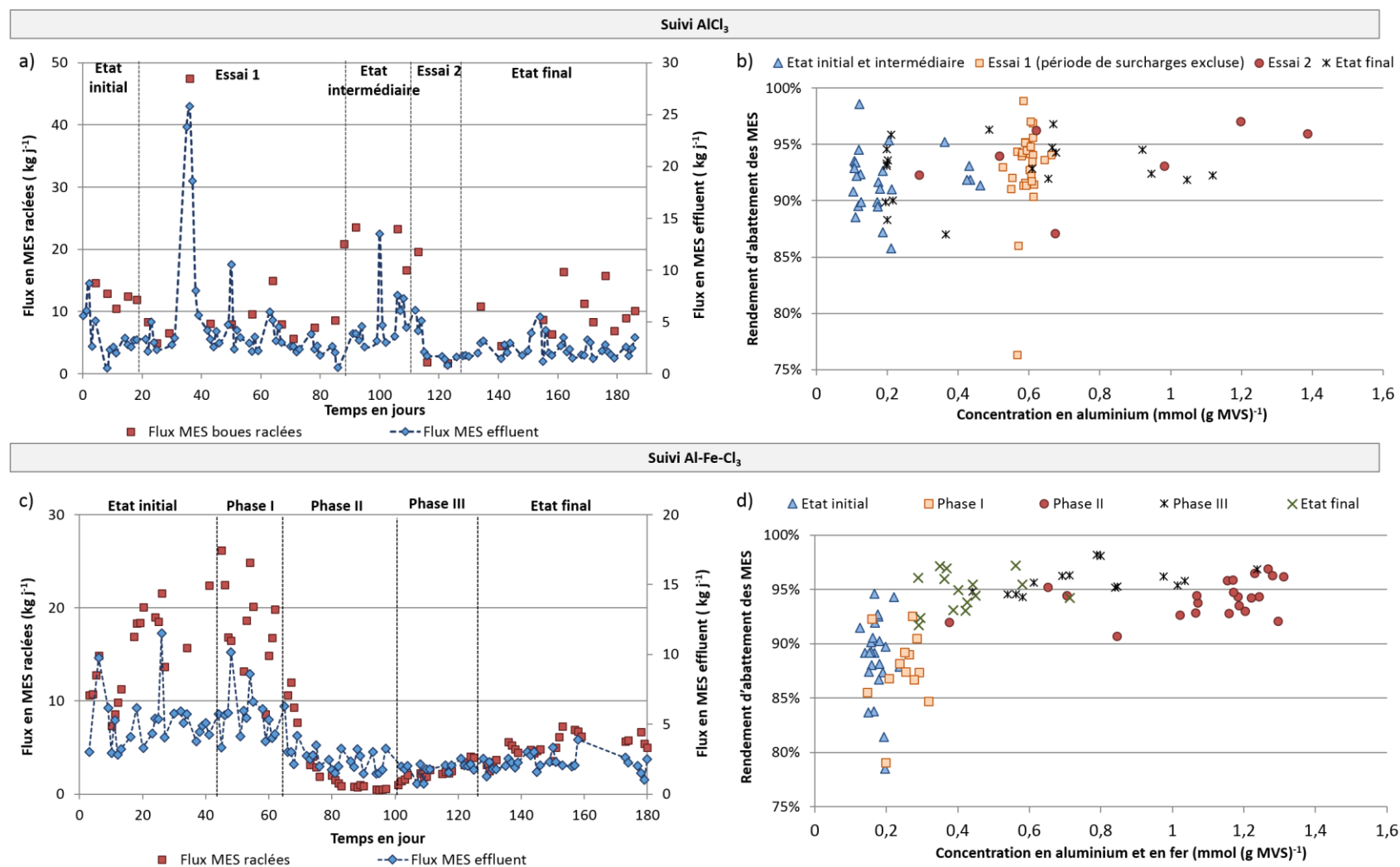


Figure V-3 : Flux de MES dans les boues racless et dans l'effluent (a et c) et évolution du rendement d'abattement des MES en fonction du ratio  $[Me]_{LM} / [MVS]$  (b et c) pour le suivi  $AlCl_3$  (a et b) et Al-Fe- $Cl_3$  (c et d)

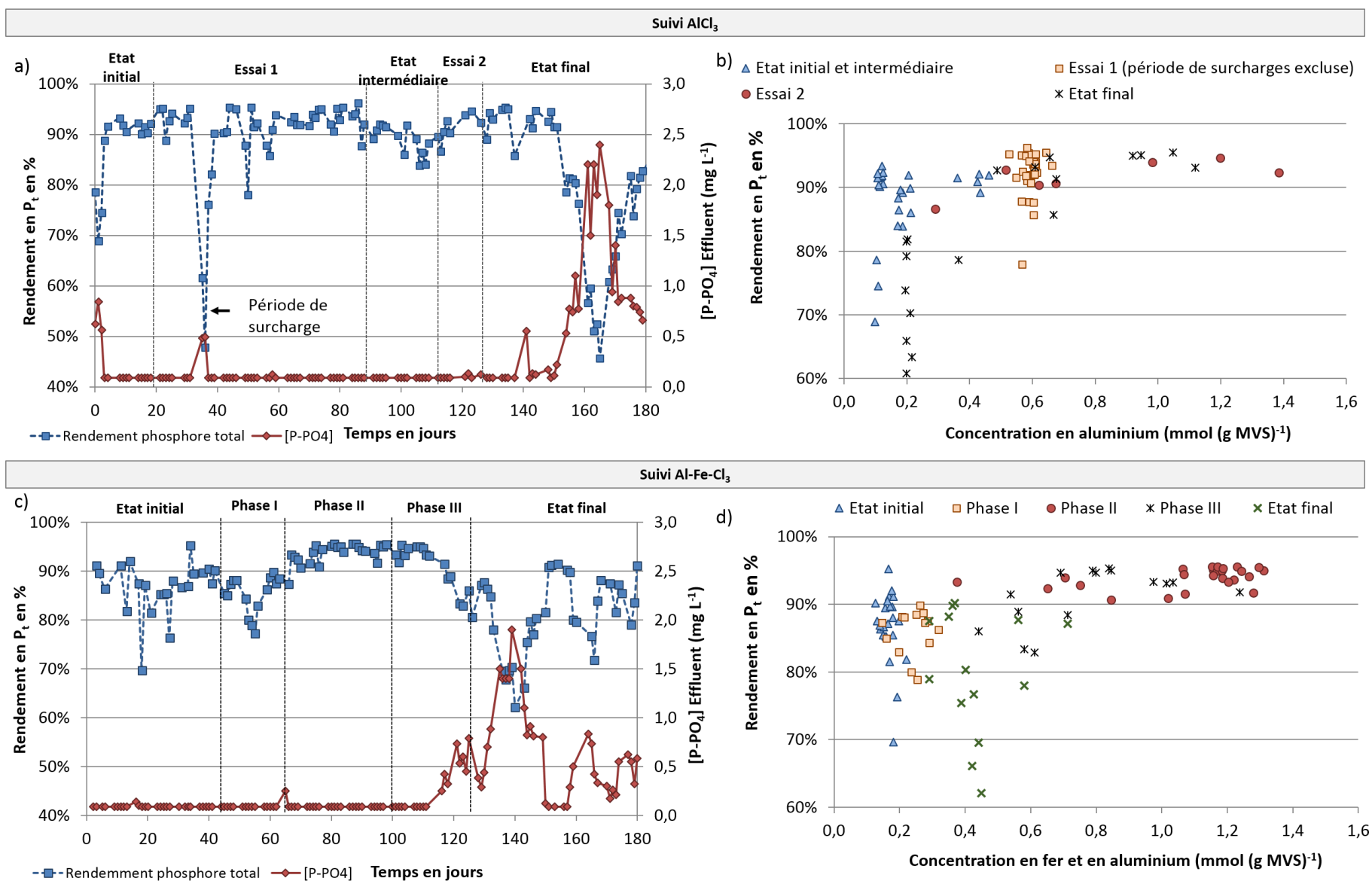
Les ajouts de sels métalliques induisent une diminution significative du flux de boues raclées et les rendements d'abattement des MES notamment pour la phase II du suivi Al-Fe-Cl<sub>3</sub>. En effet, l'ajout de 94 mmol Me (kg MES)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> induit une diminution de 90 % du flux de boues raclées et une amélioration de l'ordre de 5 à 7 % des rendements d'abattement par rapport à l'état initial et à la phase I. Après diminution du dosage en sels métalliques, le flux en MES des boues raclées et de l'effluent augmentent progressivement.

L'amélioration du traitement des MES a été relativement moins important pour le suivi AlCl<sub>3</sub> avec une diminution du flux en MES raclées de 25 % (par rapport à l'état initial) pendant l'essai 1 et de 60 % (par rapport à l'état intermédiaire) pendant l'essai 2. Une augmentation du flux de boues raclées coïncidant avec l'augmentation de l'indice de boues a été observée à partir du jour 162. Des pertes en MES ont été observées lors de l'épisode de surcharges (jours 35 à 39) et lors de certains temps de pluie (jours 49 à 50, jours 63 à 66, jour 100, jours 106 à 112, jour 153). En dehors de ces événements, le rendement d'abattement des MES est de l'ordre de 95 %.

L'ajout d'aluminium limite donc les pertes de boues dans l'effluent et fiabilise ainsi le traitement des MES. La diminution de la concentration en MES en sortie du pilote se traduit également par une légère amélioration du rendement en DCO et en azote Kjeldhal comme indiqué sur la Figure V-5.

#### V.1.2.1.2. *Traitement du phosphore*

En ce qui concerne l'abattement du phosphore, l'ajout de sels métalliques devrait *a priori* contribuer à une amélioration du rendement par précipitation des orthophosphates résiduels. L'évolution de ce rendement au cours des essais et en fonction de la concentration en sels métalliques dans les liqueurs mixtes ramenée à la concentration en MVS, est présentée sur la Figure V-4 pour les deux suivis. La concentration résiduelle en orthophosphates est également indiquée sur cette figure.



**Figure V-4: Rendement d'abattement du phosphore en fonction du temps (a et c) et en fonction de la dose de sels métalliques appliquée  $[Al]_{LM} / [MVS]$  (b et d) pour le suivi  $AlCl_3$  (a et b) et le suivi Al-Fe- $Cl_3$  (c et d)**

Avant l'ajout de sels métalliques, l'abattement du phosphore par voie biologique est bien supérieur au rendement moyen généralement constaté (60 à 70%) (Deronzier and Choubert 2004). La concentration en orthophosphates reçus en entrée du système biologique était relativement faible soit de l'ordre de  $3 \text{ mg L}^{-1}$  ( $29 \text{ mol j}^{-1}$ ) pour les deux suivis.

Les variations observées sur le rendement de déphosphatation avant et pendant quasiment toute la période des ajouts sont liées aux variations de concentration en MES dans l'effluent, la concentration résiduelle en orthophosphates étant restée inférieure à  $0,1 \text{ mg P L}^{-1}$  (limite de détection de la méthode de mesure utilisée). A la fin de la phase III du suivi Al-Fe-Cl<sub>3</sub> et après l'ajout des sels métalliques pour les deux séries de mesure, cette concentration augmente. Ces résultats indiquent l'impact négatif des sels métalliques sur la croissance des bactéries déphosphatantes.

Le Tableau V-1 synthétise les doses journalières de sels métalliques appliquées ( $\text{Me}_{\text{ajouté}}$ ) rapportées à la quantité journalière de phosphates reçus ( $\text{P}_{\text{reçu}}$ ) et à la quantité de phosphore à précipiter ( $\text{P}_{\text{à précipiter}}$ ). Ces derniers calculs ne prennent pas en compte la suraccumulation du phosphore liée à la déphosphatation biologique. Ils représentent donc la dose nécessaire pour précipiter les phosphates non assimilés par la biomasse hétérotrophe non déphosphatante (Equation II-10).

**Tableau V-1 : Dose de sels métalliques appliquée rapportée à la quantité de phosphates reçus et à précipiter**

	Dose moyenne en Me appliquée $\text{mol j}^{-1}$	Ratio molaire $\text{Me}_{\text{ajoutée}}/\text{P}_{\text{reçu}}$	Ratio molaire $\text{Me}_{\text{ajoutée}}/\text{P}_{\text{à précipiter}}$
<i>Suivi AlCl<sub>3</sub></i>			
Essai 1	22	0,7	1,43
Essai 2	87	4,3	7,22
<i>Suivi Al-FeCl<sub>3</sub></i>			
Phase I	8	0,3	0,7
Phase II	46	1,7	3,6
Phase III	7	0,3	0,5

La quantité de phosphates à précipiter, calculée selon l'Équation II-10, était de l'ordre de  $15 \text{ mol j}^{-1}$ . D'après Szabo *et al.* (2008), pour atteindre des concentrations dans l'effluent inférieures à  $1 \text{ mg L}^{-1}$ , il faudrait appliquer un ratio  $\text{Me}_{\text{ajouté}}/\text{P}_{\text{reçu}}$  supérieur à 1,5. D'après Deronzier et Choubert (2004) des ratios  $\text{Al}_{\text{ajouté}}/\text{P}_{\text{à précipiter}}$  compris entre 1,4 et 2,3 permettaient d'atteindre des rendements de déphosphatation compris entre 75 et 95 %.

Les doses appliquées en phase I et III du suivi Al-Fe-Cl<sub>3</sub> n'ont pas amélioré les rendements d'abattement du phosphore. Les ratios appliqués étaient inférieurs aux valeurs préconisées dans la littérature pour un traitement poussé du phosphore par voie physico-chimique (Deronzier and Choubert 2004; Szabo *et al.* 2008). Lors de l'essai 1, le dosage a pu avoir une action complémentaire au traitement biologique en réduisant la dispersion du rendement. En effet, la dose appliquée bien que située dans la gamme inférieure des ratios recommandés, a conduit à une amélioration de l'abattement du phosphore de l'ordre de 4 %.

Les doses appliquées lors de l'essai 2 du suivi  $\text{AlCl}_3$  et de la phase II du suivi  $\text{Al-FeCl}_3$  étaient amplement suffisantes pour un traitement physico-chimique du phosphore. Les rendements de déphosphatation obtenus sont supérieurs à 90%.

Quatre semaines après l'arrêt des injections pour le suivi  $\text{AlCl}_3$ , le rendement a diminué pour atteindre un minimum de 46 % au jour 165, pour ensuite ré-augmenter progressivement. La période correspondante (jours 154 à 176) est associée à plusieurs temps de pluie (Figure IV-9) ce qui pourrait expliquer en partie cette diminution en lien avec la réduction de la DCO facilement assimilable.

Une diminution des rendements a également été observée sur le suivi  $\text{Al-Fe-Cl}_3$  au cours de la phase III ( $\approx$  jour 112 à 140) puis à la fin de l'état final ( $\approx$  jour 157 à 166). Contrairement au suivi  $\text{AlCl}_3$ , la première diminution ne coïncide pas avec un temps de pluie, qui ne survient qu'à partir du jour 155 (Figure IV-9).

Il est probable que, dans les deux cas, l'ajout de sels métalliques ait eu un impact négatif sur la croissance des bactéries déphosphatantes.

### V.1.2.1.3. Synthèse

L'évolution des rendements d'abattement des différents paramètres d'intérêt est représentée sur la Figure V-5 pour les différentes phases des suivis  $\text{AlCl}_3$  et  $\text{Al-Fe-Cl}_3$ .

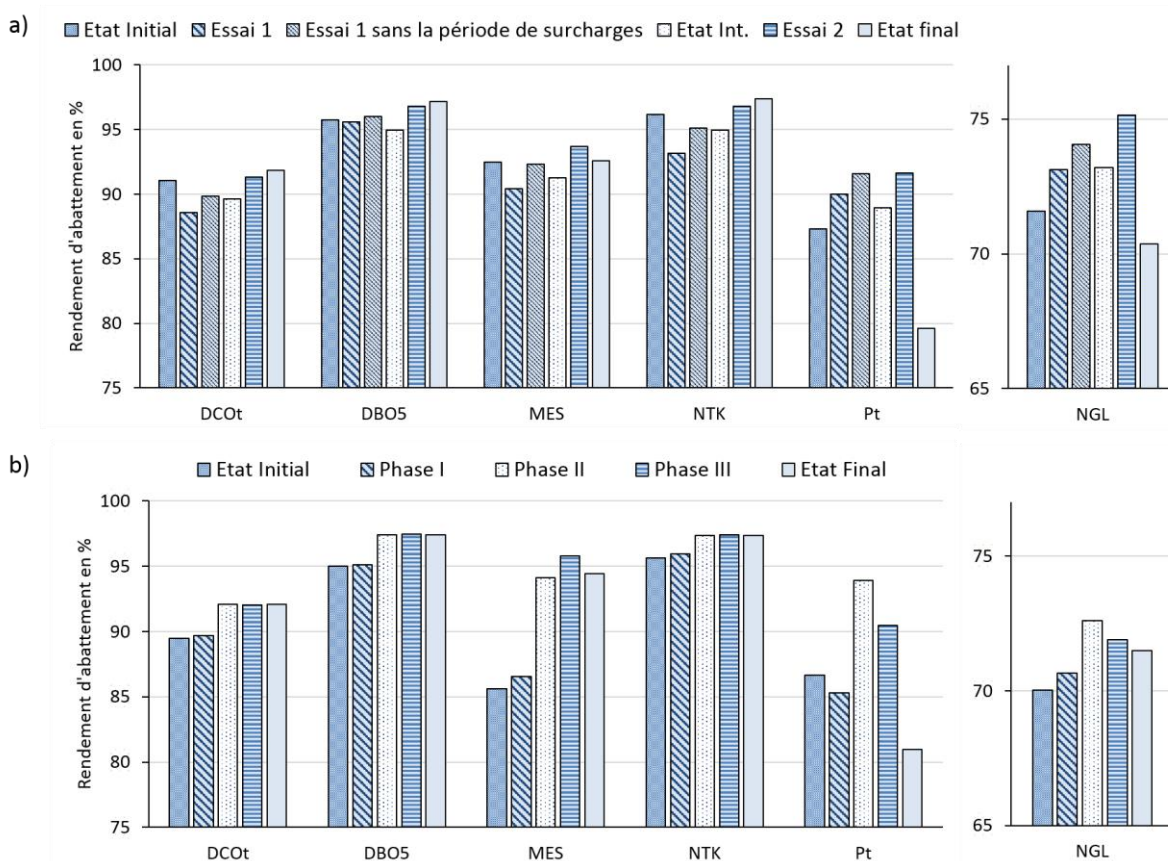


Figure V-5 : Rendements d'abattement des différents paramètres d'intérêt pour le suivi  $\text{AlCl}_3$  (a) et  $\text{Al-Fe-Cl}_3$  (b)

De manière générale, l'ajout de sels d'aluminium limite les pertes de boues et la formation de flottants qui peuvent entraîner une altération des rendements épuratoires. Les rendements

d'abattement des MES ont donc été légèrement améliorés, de même que ceux de la DCO et de l'azote, en lien avec la diminution des matières en suspension en sortie du clarificateur.

Les rendements de déphosphatation ont augmenté de façon plus significative, notamment pour les doses testées les plus élevées correspondant à des ratios molaires bien supérieurs aux valeurs nécessaires à l'abattement du phosphore par voie physico-chimique. L'ajout des sels métalliques semble par ailleurs avoir eu un impact négatif sur la biomasse déphosphatante.

## **V.2. Impact des sels métalliques sur les bactéries filamenteuses et les agrégats biologiques**

Les observations en microscopie classique ont permis d'identifier et d'estimer l'abondance relative des bactéries filamenteuses. Cette abondance a été caractérisée à l'aide de l'indice filamenteux (IF) global pour l'ensemble des bactéries filamenteuses et d'un indice spécifique à chaque espèce (Jenkins *et al.* 2004).

Le développement de certaines bactéries filamenteuses peut induire l'ouverture et/ou le pontage des agrégats biologiques, impactant directement leur décantation. Une attention particulière a donc été portée à la morphologie de ces derniers. Des observations en FISH ont permis de confirmer l'identification de certaines bactéries filamenteuses et d'apporter des éléments de précision quant à la spécificité de l'impact des sels d'aluminium. Des observations en MEB ont permis d'approfondir ces investigations puis, couplées à des microanalyses chimiques, de préciser si l'aluminium était adsorbé, ou non, de façon spécifique sur certains éléments des boues activées.

### **V.2.1. Évolution de l'abondance relative des bactéries filamenteuses et de la morphologie des agrégats biologiques**

Les dysfonctionnements biologiques constatés, foisonnement et moussage, étaient dus au développement excessif de *M. parvicella* pour les deux suivis. D'autres bactéries filamenteuses étaient présentes, notamment Type 0041/0675, Type 0092, *N. limicola* et *Thiothrix sp.* en abondance plus ou moins modérée selon le suivi. Les différentes morphologies observées après coloration Gram et Neisser sont données en Annexe 12.

Les évolutions de l'indice filamenteux global et relatif aux bactéries filamenteuses observées, l'indice de boues, la température dans le bassin C2 et la morphologie des agrégats biologiques sont synthétisées sur le Tableau V-2 pour le suivi  $\text{AlCl}_3$  et dans le Tableau V.3 pour le suivi  $\text{Al-Fe-Cl}_3$ .

Tableau V-2 : Caractérisation des agrégats biologiques, de la biodiversité et de l'abondance des bactéries filamenteuses en lien avec les conditions de décantation – Suivi  $AlCl_3$ 

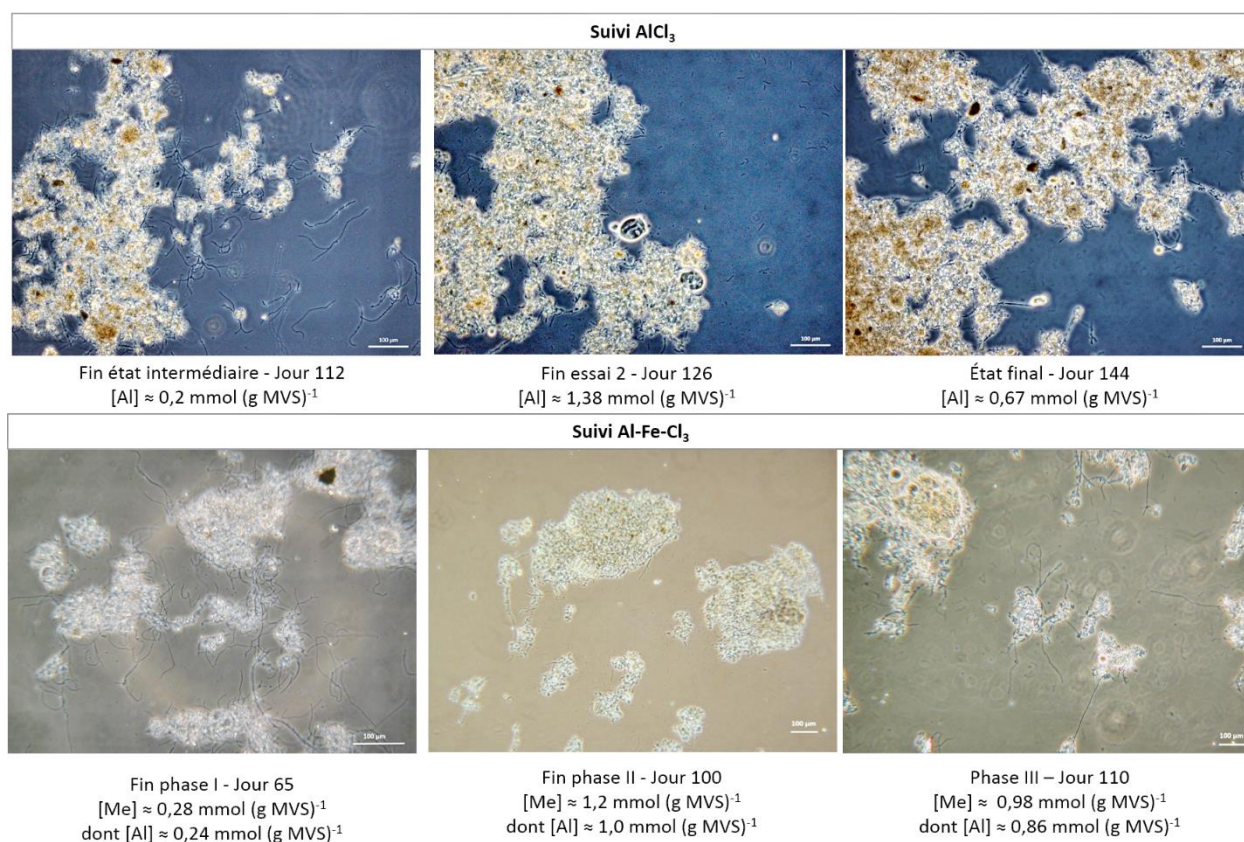
	Etat initial Semaine 1 à 3	Essai 1 Semaine 4 à 13		Etat intermédiaire Semaine 14 à 16		Essai 2 Semaine 17 à 18		Etat final Semaine 19 à 22		Etat final Semaine 27	
T°C bassin aéré	16	[13 -19]		[17 – 19]		[16 – 19]		[17.8 – 21.9]		22,6	
Mousses	Présentes	Disparition au bout de 11 jours		Réapparition progressive		Disparition au bout de 1 jour		Fine couche non persistante (1 à 5 cm) à partir de la semaine 21		Non observées	
IB	160	Stable	≈150	Augmentation rapide semaine 16	[133 – 190]	Diminution	110	Stable	100	Augmentation	126
IF	[4-5]	Globalement stable	≈ 4	Augmentation immédiate	5	Diminution	5 à 3	Stable	[2-3]	Légère augmentation	
M. parvicella	[4-5]	Globalement stable	≈ 4	Augmentation immédiate	4 à 5	Diminution	5 à 3	Stable	[2-3]	Stable	3
Type 0041/0675	[2-3]	Diminution puis augmentation	[1-2]	Légère augmentation	[2-3]	Stable	[2-3]	Stable	[2-3]	Stable	[2-3]
Type 0092	< 2	Légère diminution	1	Stable	1	Légère diminution	< 1	Stable	< 1	Augmentation	2 à 3
Thiothrix sp.	< 1	Augmentation	< 2	Stable	<2	Diminution	< 1	Stable	≈ 0	Stable	≈ 0
N. limicola	1	Globalement stable	< 2	Stable	< 2	Diminution	≈ 1	Stable	≈ 1	Stable	1
Bactéries filamenteuses dans le liquide interstitiel	Présentes	Présentes, densité légèrement plus faible		Présentes		Absentes		Réapparition à partir de la semaine 21		Présentes	
Morphologie des agrégats	Ouverts avec pontages inter-flocs	Peu ouverts mais diffus		Ouverts avec pontages inter-flocs		Compacts et de taille > 500 µm		Compacts et de taille > 500 µm avant réouverture progressive		Ouverts avec pontages inter-flocs	

Tableau V-3 : Caractérisation des agrégats biologiques, de la biodiversité et de l'abondance des bactéries filamenteuses en lien avec les conditions de décantation - Suivi Al-Fe-Cl3

	Etat initial Semaine 6	Phase I Semaine 7 à 9	Phase II Semaine 10 à 14	Phase III Semaine 14 à 18	Etat final Semaine 19 à 22
<b>T°C bassin aéré</b>	16	[13 -16]	[16 – 20]	[19 – 21]	[21 – 22]
<b>Mousses</b>	Présentes sur l'ensemble des bassins	Persistantes sur le bassin C1	Absentes	Absentes	Absentes
<b>IB</b>	202	Légère diminution ≈174	Diminution progressive [187 -99]	Augmentation [88- 167]	Stabilisation ≈ 111
<b>IF</b>	4	Stable	4 Légère diminution	[3 – 4] Stable	[3 – 4] Stable
<b><i>M. parvicella</i></b>	4	Stable	4 Légère diminution	De 4 à 3 Globalement stable	3 Globalement stable [3-4]
<b>Type 0041/0675</b>	< 1	Stable	≈1 Légère augmentation	De 1 à 2 Diminution	De 2 à 1 Stable
<b>Type 0092</b>	2	Stable	2 Diminution	De ≈ 3 à 1 Stable	1 Légère augmentation De 1 à 2
<b><i>Thiothrix sp.</i></b>	[1 - 2]	Stable	2 Variable	[1 -3] Variable	[1 -3] Stable
<b><i>N. limicola</i></b>	1	Globalement stable	[1 -2] Globalement stable	[1 -2] Globalement stable	[1 -2] Globalement stable
<b>Bactéries filamenteuses dans le liquide interstitiel</b>	Présentes	Abondance stable	Diminution rapide jusqu'à disparition complète semaine 13	Peu nombreuses – réapparition semaine 16	Stable
<b>Morphologie des agrégats</b>	Diffus avec pontages inter-flocs	Diffus avec pontages inter- flocs	Dès les 1 <sup>ères</sup> semaines floccs plus compacts et légère augmentation de leur taille	Réouverture progressive des floccs (semaine 16)	Floccs peu ouverts

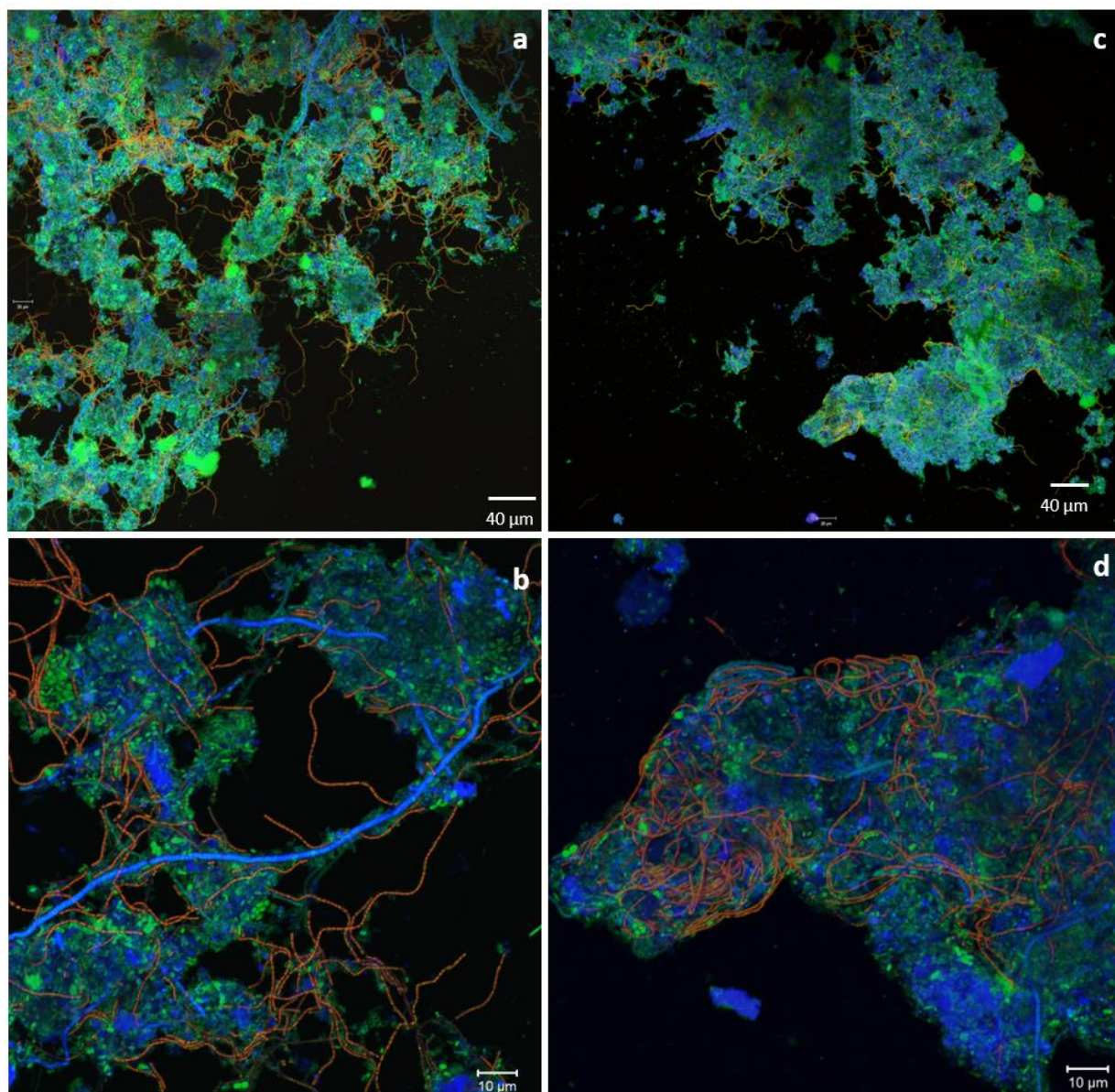


L'évolution de la morphologie des agrégats biologiques et de la présence des bactéries filamenteuses dans le liquide interstitiel observées en contraste de phase, est illustrée sur la Figure V-6 pour les deux suivis.



**Figure V-6 : Evolution de la morphologie des agrégats biologiques et de la présence de bactéries filamenteuses dans le liquide interstitiel – Observation en contraste de phase**

Nielsen *et al.* (2005) avaient observé l'internalisation de *M. parvicella*. Afin de préciser si ce phénomène était spécifique à *M. parvicella*, des observations en FISH ont été réalisées avec une co-hybridation des sondes spécifiques à *M. parvicella* (marquage rouge) et aux bactéries filamenteuses du *phylum Chloroflexi* (marquage bleu) avec en parallèle un marquage généraliste des bactéries (marquage vert). Les principaux résultats pour l'essai 2 du suivi  $\text{AlCl}_3$  sont présentés sur la Figure V-7. Les mêmes investigations ont été réalisées pour le suivi  $\text{Al-Fe-Cl}_3$ , les résultats sont présentés en Annexe 144.



**Figure V-7 : Observations microscopiques en FISH des bactéries filamenteuses des boues activées**  
 Marquage FISH : *M. parvicella* → MPAmix (rouge) – Phylum Chloroflexi → CFXmix (bleu) – bactéries → EUBmix (vert)  
 a) et b) Etat intermédiaire –  $[Al] = 0,2 \text{ mmol Al (g MVS)}^{-1}$  (jour 112) - c) et d) Essai 2 -  $[Al] = 0,9 \text{ mmol (g MVS)}^{-1}$  (jour 119)

Les impacts des différents ajouts réalisés sont décrits dans les paragraphes suivant par ordre croissant des doses appliquées.

- Ajout de  $16 \text{ mmol Me (kg MES)}^{-1} \text{ j}^{-1}$  (suivi Al-Fe-Cl<sub>3</sub> phase I)

La semaine précédant la phase I du suivi Al-Fe-Cl<sub>3</sub>, l'IF global et relatif à *M. parvicella* était de 4. Les bactéries filamenteuses étaient très présentes dans le liquide interstitiel, les agrégats biologiques légèrement ouverts et leurs contours diffus.

L'ajout de  $16 \text{ mmol Me (kg MES)}^{-1} \text{ j}^{-1}$  n'a pas eu d'impact significatif, ni sur l'abondance des bactéries filamenteuses, ni sur la structure des agrégats biologiques. Cette dose n'a pas non plus évité la réouverture progressive des agrégats biologiques en phase III, ainsi que l'augmentation de l'IF global et la réapparition des bactéries filamenteuses dans le liquide interstitiel, notamment à partir du jour 110 (semaine 16 –  $[Me]_{LM} \approx 0,9 \text{ mmol Me (g MVS)}^{-1}$ ) (Tableau V-3).



L'augmentation de l'indice de boues les semaines 17 et 18 peut être associée à une augmentation d'une unité de l'indice filamenteux global ainsi qu'à l'altération de la morphologie des agrégats biologiques et du liquide interstitiel (Tableau V-3 et Figure V-6).

- Ajout de 41 mmol Al (kg MES)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> (suivi AlCl<sub>3</sub> essai 1)

La semaine précédant l'essai 1 du suivi AlCl<sub>3</sub>, l'IB était en moyenne de 160 mL g<sup>-1</sup> et l'indice filamenteux global dans les liqueurs mixtes ainsi que l'IF relatif à *M. parvicella* étaient compris entre 4 et 5.

Malgré le relativement faible impact du traitement sur l'abondance des bactéries filamenteuses (diminution de l'IF global de moins d'une unité), la stabilisation de l'IB durant l'essai 1 du suivi AlCl<sub>3</sub> s'explique par la légère modification de la morphologie des agrégats. La concentration moyenne en aluminium dans les liqueurs mixtes était alors de 0,6 mmol (g MVS)<sup>-1</sup>.

A l'étape intermédiaire, les conditions de décantation se sont dégradées avec la diminution progressive de la concentration en aluminium dans les boues (inférieure à 0,3 mmol (g MVS)<sup>-1</sup> à partir du jour 99). L'IF global a augmenté ainsi que les IF spécifiques de *M. parvicella* et de Type 0041/0675, entraînant une ouverture plus marquée des agrégats biologiques et la présence de pontages inter-flocs (Figure V-6).

- Ajout de 94 mmol Me (kg MES)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> (suivi Al-Fe-Cl<sub>3</sub> phase II)

La diminution de l'indice de boues durant la phase II du suivi Al-Fe-Cl<sub>3</sub>, s'explique notamment par une modification de la morphologie des agrégats dès les premières semaines d'ajout des sels métalliques. La concentration dans les liqueurs mixtes était en moyenne de 1,1 mmol (g MVS)<sup>-1</sup> durant cette période. L'amélioration des conditions de décantation s'explique également par l'internalisation dans les agrégats biologiques des bactéries filamenteuses et leur diminution progressivement dans le liquide interstitiel jusqu'à disparition à partir du jour 89 (semaine 13) (Annexe 14 et Tableau V-3). L'indice filamenteux global a diminué d'une unité, ainsi que l'IF relatif à *M. parvicella* et à Type 0092. Une augmentation d'une unité a été observée pour l'abondance relative de *Thiothrix sp.* et *N. limicola*.

- Ajout de 137 mmol Al (kg MES)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> (suivi AlCl<sub>3</sub> essai 2)

Lors de l'essai 2, l'IB a rapidement diminué pour atteindre des valeurs globalement inférieures à 110 mL g<sup>-1</sup> à partir du jour 126 (paragraphe V.1). Ceci est associé à la modification de la morphologie des agrégats biologiques, notamment à partir du jour 119, la disparition des bactéries filamenteuses du liquide interstitiel et la diminution de leur abondance relative pour *M. parvicella*, *Thiothrix sp.* et *N. limicola* (Tableau V-2 et Figure V-6). L'internalisation des bactéries filamenteuses du type 0041/0675 et de *M. parvicella* pour des concentrations supérieures à 0,9 mmol (g MVS)<sup>-1</sup> a également contribué à l'amélioration de la morphologie des agrégats biologiques (Figure V-7). En effet, les bactéries filamenteuses étaient rarement observées dans le liquide interstitiel mais présentes en forte proportion à l'intérieur des agrégats biologiques. Les filaments de *M. parvicella* et du phylum *Chloroflexi* étaient longs mais compactés à l'intérieur des agrégats biologiques.

Pour une concentration en aluminium inférieure à  $0,7 \text{ mmol (g MVS)}^{-1}$  (à partir de la semaine 21), la réouverture progressive des agrégats biologiques a été observée et les bactéries filamenteuses étaient à nouveau présentes dans le pourtour des agrégats et dans le liquide interstitiel. Les conditions de décantation se sont progressivement dégradées.

#### V.2.1.1. Synthèse

L'ensemble des résultats met en évidence que la stabilisation ou la diminution de l'indice de boues s'explique notamment par la modification de la morphologie des agrégats avec l'internalisation des bactéries filamenteuses.

Pour des concentrations de l'ordre de  $0,6 \text{ mmol Me (kg MVS)}^{-1} \text{ j}^{-1}$ , les agrégats biologiques sont diffus et peu denses mais l'indice de boues semble pouvoir être stabilisé à des valeurs de l'ordre de  $150 \text{ mL g}^{-1}$ .

Pour des concentrations supérieures à  $0,7 \text{ mmol Me (kg MVS)}^{-1} \text{ j}^{-1}$  dans les liqueurs mixtes, les agrégats biologiques sont plus compacts et les bactéries filamenteuses internalisées, contribuant ainsi à l'amélioration des conditions de décantation et à maintenir des valeurs d'IB inférieures à  $150 \text{ g mL}^{-1}$ .

Après diminution des dosages, aussi bien pour le suivi  $\text{AlCl}_3$  que le suivi  $\text{Al-Fe-Cl}_3$ , une ouverture progressive des agrégats et une augmentation de l'abondance en bactéries filamenteuses ont été observées. En accord avec la littérature, les effets de l'ajout des sels d'aluminium sont temporaires (Nielsen *et al.* 2005; Paris *et al.* 2005) et corrélés à l'extraction progressive de l'aluminium et/ou du fer.

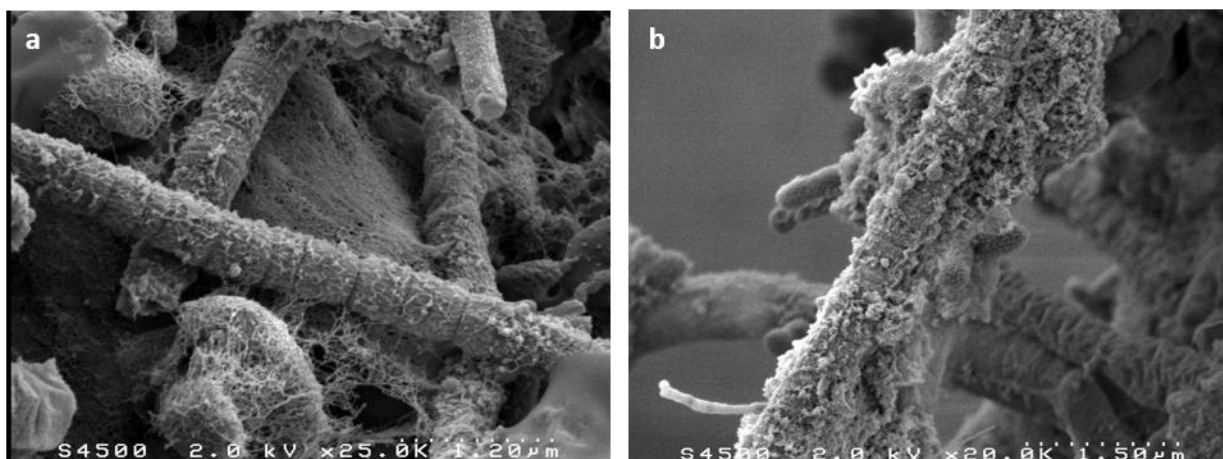
Comme Nielsen *et al.* (2005) l'avaient observé, suite à l'ajout de sels métalliques, notamment de l'aluminium, *M. parvicella* a été intégré dans les agrégats biologiques. Les observations en FISH indiquent que les bactéries filamenteuses du *phylum Chloroflexi* le sont également. Ce phénomène n'est donc pas spécifique à *M. parvicella*. Or toujours d'après Nielsen *et al.* (2005), l'internalisation de *M. parvicella* serait due à la neutralisation des charges négatives des agrégats par l'aluminium. En l'absence de charge négative, *M. parvicella* qui est très hydrophobe, serait attiré par la matrice biologique alors plus neutre que le liquide interstitiel. En ce qui concerne le *phylum Chloroflexi*, ni Type 0041/0675 ni Type 0092 ne sont reconnues pour être hydrophobes. Type 0041/0675 est Gram variable et possède une gaine épaisse avec des adhérences cellulaires le plus souvent Gram négatives (Thomsen *et al.* 2002; Jenkins *et al.* 2004). Type 0092 est Gram négative et non gainée. Les structures externes de ces bactéries possèdent des propriétés biochimiques différentes.

Par conséquent, des propriétés autres que l'hydrophobicité sont à l'origine de cette internalisation. Il pourrait s'agir d'interactions chimiques entre l'aluminium (cation trivalent) et les polysaccharides ou les protéines, présents en surface des bactéries. D'autres groupes fonctionnels pourraient être impliqués suivant le type de bactérie, le pH du milieu et le cation mis en jeu (Li and Yu 2014).

## V.2.2. Impact de l'aluminium sur la morphologie des bactéries filamenteuses

### V.2.2.1.1. Mise en évidence de dépôts à la surface des bactéries filamenteuses

Afin de préciser l'impact de l'aluminium sur la morphologie des bactéries filamenteuses et son accumulation à leur surface, des observations en microscopie électronique à balayage (MEB) ont été réalisées pour l'essai 2 du suivi  $\text{AlCl}_3$ . Un exemple d'images obtenues est présenté sur la Figure V-8.



**Figure V-8 : Observations en MEB des agrégats biologiques des boues activées**  
*a) Etat intermédiaire-  $[\text{Al}] = 0,2 \text{ mmol Al (g MVS)}^{-1}$  (jour 112) - b) Essai 2 -  $[\text{Al}] = 0,9 \text{ mmol (g MVS)}^{-1}$  (jour 119)*

Avant l'injection des sels métalliques, les détails structurels tels que les *septa* des bactéries filamenteuses étaient nets et discernables (Figure V-8.a).

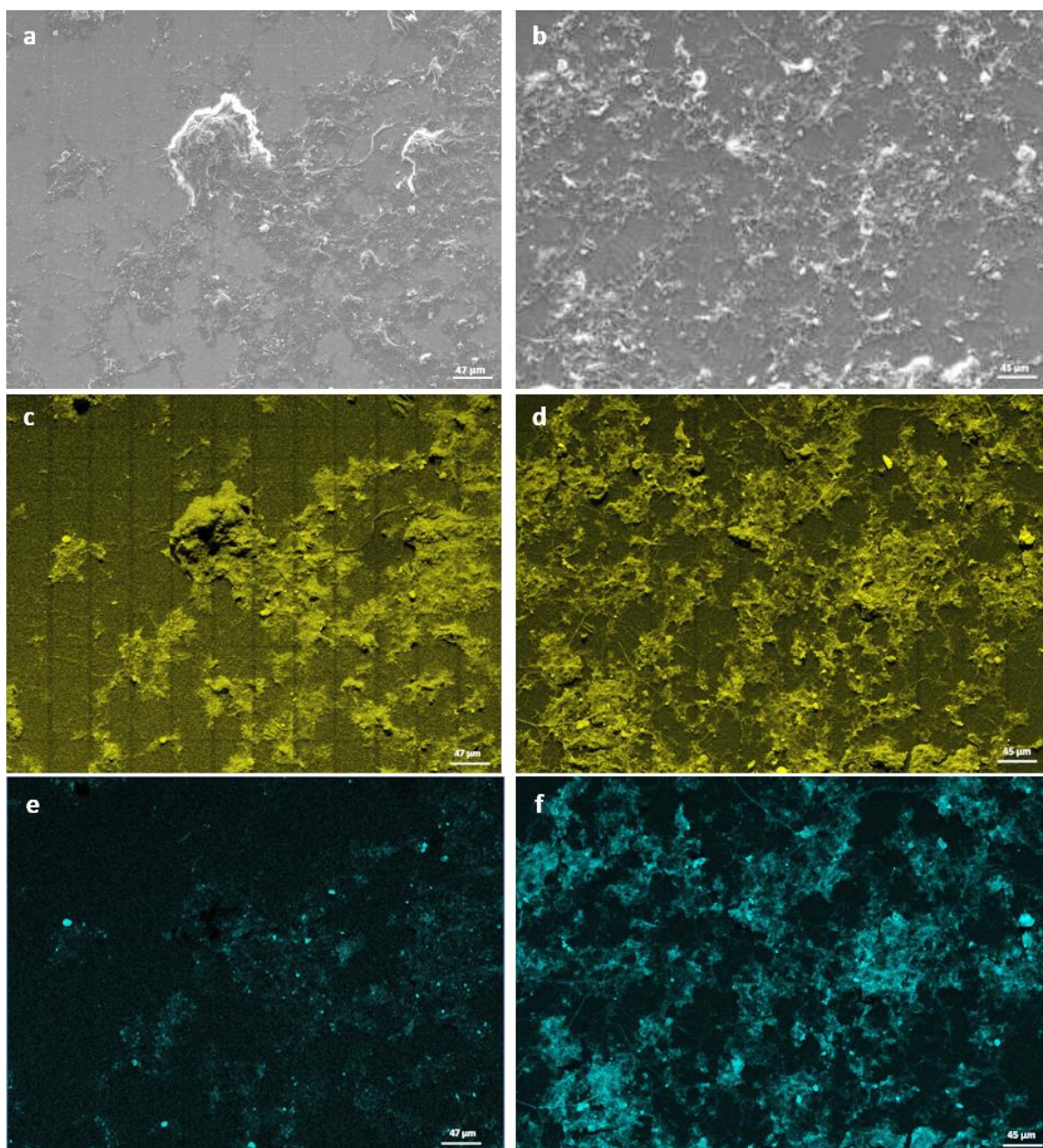
Au bout d'une semaine de traitement (concentration de  $0,9 \text{ mmol Al (g MVS)}^{-1}$ ), les détails structurels des bactéries filamenteuses n'étaient plus nettement observables. Des éléments amorphes, formant un dépôt d'épaisseur variable, ont été observés sur leur surface mais aucune altération membranaire ou de déformation des cellules n'ont été observées (Figure V-8.b). Ces observations ont été également confirmées après deux semaines de traitement.

### V.2.2.1.2. Caractérisation des dépôts alumineux

Afin de vérifier la présence d'un enrichissement en aluminium au niveau de ces dépôts et si sa proportion variait, des micro-analyses chimiques couplées à des observations en MEB ont été effectuées.

Les analyses ont été réalisées sur deux échantillons, une semaine avant le démarrage de l'essai 2 (jour 105,  $0,2 \text{ mmol (g MVS)}^{-1}$ ) et le 11<sup>ème</sup> jour de l'essai 2 (jour 123,  $1,2 \text{ mmol (g MVS)}^{-1}$ ). L'assemblage des 120 images sous forme de matrice pour l'EDX de l'oxygène et de l'aluminium ainsi que pour les acquisitions en MEB, est présenté sur la Figure V-9.



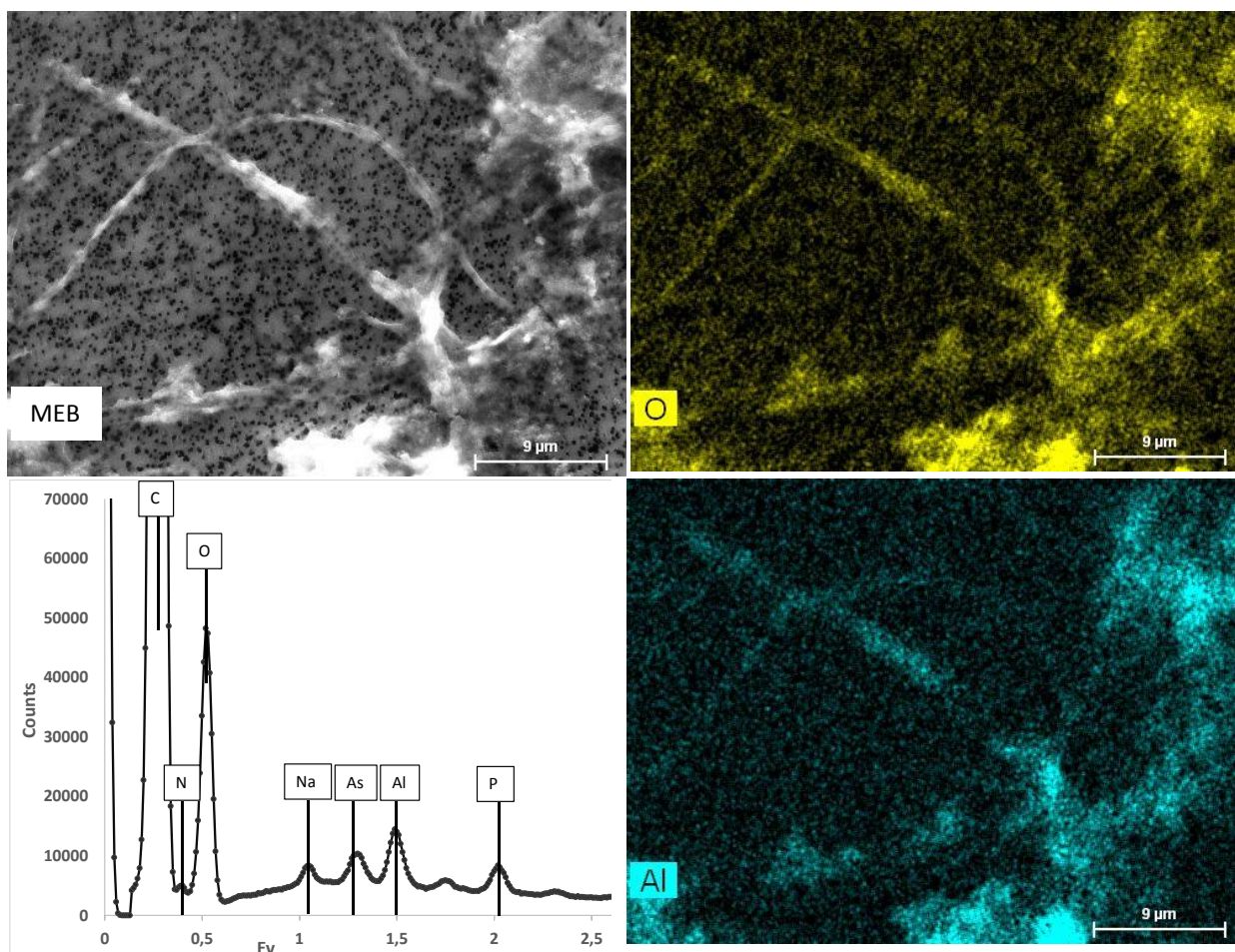


**Figure V-9 : Observation en MEB-EDX des agrégats biologiques des boues activées–  
images de gauche (champs identiques) : Etat intermédiaire -  $[Al] = 0,2 \text{ mmol (g MVs)}^{-1}$  (jour 105) –  
Images de droite (champs identiques) : Essai 2 -  $[Al] = 1,2 \text{ mmol (g MVs)}^{-1}$  (jour 123)  
a) – b) : Observation en MEB / c)-d) : EDX de l’oxygène / e) – f) : EDX de l’aluminium**

Avant l’ajout d’aluminium, l’ensemble des objets observés en MEB (Figure V-9. a) était détecté en EDX pour l’oxygène (Figure V-9. c), tandis que le signal EDX de l’aluminium était quasiment nul (Figure V-9. e). L’aluminium n’était présent qu’à l’état de traces, détecté sur quelques objets qui pourraient correspondre à des éléments minéraux.

Après 11 jours d’injection, l’ensemble des objets observés en MEB (Figure V-9. b) était détecté en EDX pour l’oxygène et pour l’aluminium (Figure V-9. d et f). Ces deux éléments étaient répartis de façon homogène sur l’ensemble des agrégats biologiques à l’exception de quelques objets d’origine minérale (Figure V-9. d et f). De par l’épaisseur des agrégats biologiques, l’aluminium semblait plus concentré sur ces derniers, mais aucune suraccumulation ou précipitation spécifique de l’aluminium n’a été observée au niveau des bactéries filamenteuses.

Afin de préciser la nature des dépôts précédemment observés à la surface des bactéries filamenteuses, des images supplémentaires ont été réalisées avec des temps d'acquisition plus importants (20 min) (Figure V-10).



**Figure V-10 : Observations en MEB et analyses EDX des bactéries filamenteuses d'un même champ**  
**Essai 2 (jour 123) - O : oxygène – Al : Aluminium**  
**Les traces d'arsenic observées sont dues à la méthode de fixation de l'échantillon.**

Les observations mettent en évidence que l'aluminium est bien présent en surface des bactéries filamenteuses mais en faible proportion. De plus, les dépôts précédemment observés ne sont pas plus riches en aluminium que les agrégats biologiques. Les seuls précipités observés sont associés à du phosphore ou du calcium.

#### **V.2.2.1.3. Conclusion**

Les observations microscopiques en MEB et en MEB-EDX ont montré que l'aluminium ajouté s'adsorbe à la surface de la matière organique de façon aspécifique et n'induit aucune altération ni modification notable de la membrane des bactéries filamenteuses.



### V.3. Impact des sels métalliques sur les populations microbiennes des boues activées

Afin d'évaluer l'impact de l'ajout des sels d'aluminium sur la diversité des populations microbiennes des boues activées, un inventaire moléculaire de l'ADNr 16S pour 6 échantillons d'intérêt du suivi  $AlCl_3$  a été réalisé. Un suivi de la biodiversité des AOB a également été réalisé par DGGE pour les deux suivis afin de préciser le potentiel impact des sels métalliques sur les bactéries nitrifiantes, qui représentent une population minoritaire mais essentielle pour le fonctionnement des installations du type boues activées faible charge.

L'impact des sels métalliques sur la quantité des populations d'intérêt a enfin été observé par PCR quantitative. Les communautés bactériennes suivantes ont été suivies à l'aide des amorces présentées au paragraphe II.6.2.1 : bactéries totales, autotrophes (AOB), déphosphatantes (*Accumulibacter phosphatis*, PAO) et *M. parvicella*.

#### V.3.1. Impact des sels métalliques sur la diversité des populations microbiennes

##### V.3.1.1. Diversité des boues activées lors du suivi $AlCl_3$

Un inventaire moléculaire sur l'ADNr 16S a été réalisé sur six échantillons du suivi  $AlCl_3$  afin d'apporter des précisions sur l'impact de l'aluminium. Les échantillons ont été ainsi choisis :

- Un échantillon témoin (jour 14 -  $[Al] = 0,12 \text{ mmol Al (g MVS)}^{-1}$ ) ;
- Un échantillon avant (jour 28 -  $[Al] = 0,6 \text{ mmol Al (g MVS)}^{-1}$ ) et après la période de surcharges (jour 42 -  $[Al] = 0,6 \text{ mmol Al (g MVS)}^{-1}$ ), afin d'évaluer la sensibilité de la technique ;
- Un échantillon avant l'essai 2 (jour 112 -  $[Al] = 0,18 \text{ mmol Al (g MVS)}^{-1}$ ) ;
- Un échantillon après 7 jours de traitement (essai 2 : jour 119 -  $[Al] = 0,94 \text{ mmol Al (g MVS)}^{-1}$ ) ;
- Un échantillon en fin d'essai (jour 126 -  $[Al] = 1,4 \text{ mmol Al (g MVS)}^{-1}$ ), afin d'étudier le possible impact de l'aluminium au plus fort dosage sur la biodiversité microbienne.

Les courbes de raréfaction et les indices de diversité et de richesse (Tableau V-4) suggèrent qu'une importante fraction de la biodiversité des échantillons est analysée, permettant l'identification de la plupart des groupes bactériens présents (ratio OTU/Chao1 > 50 %).

Tableau V-4 : Indicateurs de diversité

	Phases du suivi	Nombre d'OTU total	Chao1	Shannon	1-Simpson
Jour 14	Etat initial	3949	5082	8,513	0,988
Jour 28	Essai 1	4476	5786	8,672	0,988
Jour 42		3588	4681	8,047	0,984
Jour 112	Etat intermédiaire	4119	5457	8,446	0,986
Jour 119	Essai 2	5426	7304*	7,973	0,979
Jour 126		3304	4438	7,420	0,958

\* Indice de Chao biaisé par le nombre de séquences deux fois plus élevé que pour les autres échantillons.



Les échantillons sont riches en OTU (Operational Taxonomic Unit, comprises entre 3 304 et 5 426) et ont une répartition équitable des espèces entre les OTU ( $1\text{-Simpson} > 0,95$ ). L'association de ces critères reflète une biodiversité élevée pour ces échantillons notamment par rapport à l'étude de Wang *et al.* (2012). Ils avaient obtenu des indices de Shannon compris entre 6,9 et 7,3 pour des stations réalisant un traitement de l'azote et du phosphore.

Quelques différences entre les échantillons sont tout de même observables. Pour les échantillons des jours 119 et 126, les valeurs plus faibles des indices de Shannon et de  $1\text{-Simpson}$  indiquent qu'ils sont moins diversifiés. L'échantillon du jour 42 a une diversité intermédiaire avec notamment une diminution notable de la richesse par rapport au jour 28.

Des analyses statistiques ont été réalisées sous R afin de générer des cartes d'abondance («heat-map») et des analyses à composantes principales (ACP). Les résultats de ces analyses sont décrits en Annexe 15. La distribution taxonomique des échantillons selon l'abondance relative pour chaque *phylum* est représentée sur la Figure V-11.

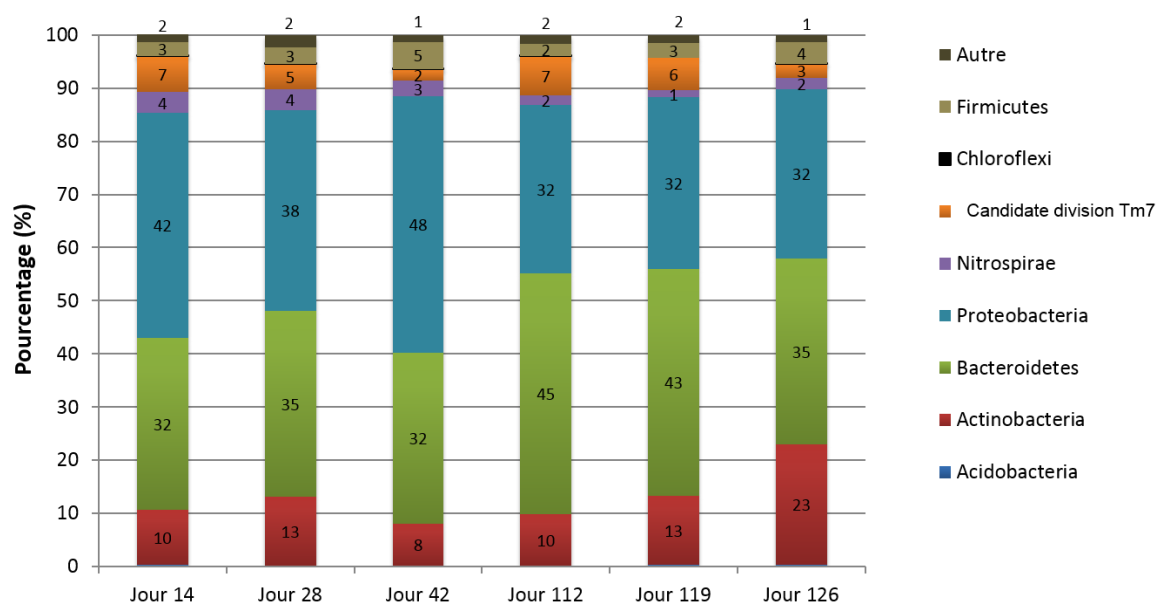


Figure V-11 : Distribution taxonomique suivant les différents phylums majeurs

La distribution taxonomique du *phylum* des *Actinobacteria* et des *Proteobacteria* est donnée sur la Figure V-12. *Nitromonas sp.* représente 71% des espèces des *Nitrosomadales* qui ont une abondance relative comprise entre 0,4 et 1,4 %. Les séquences représentatives des OTU majeures correspondent à *N. oligotropha*.

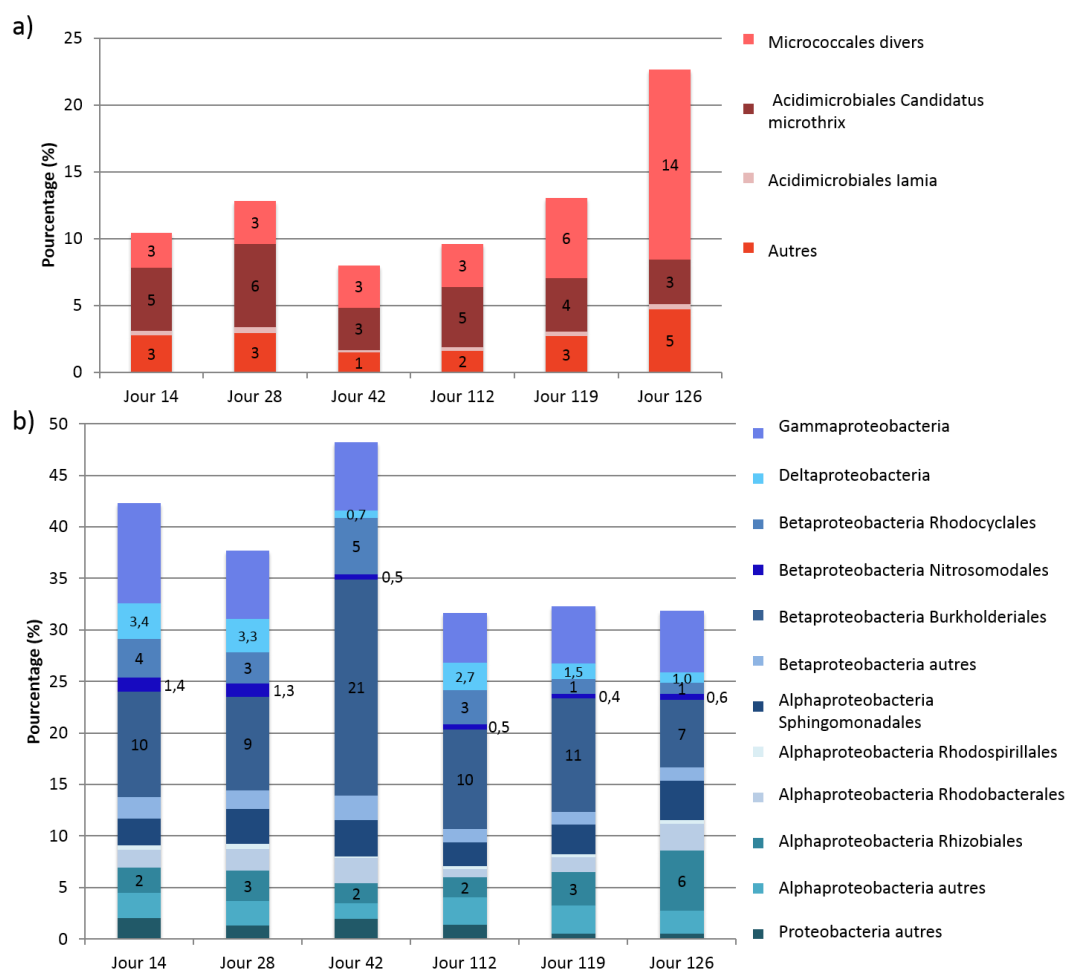


Figure V-12 : Distribution taxonomique du phylum des Actinobacteria (a) et des Proteobacteria (b)

Les *Proteobacteria* (38 – 48%) et les *Bacterioidetes* (32-45%) sont dominants sur l'ensemble des échantillons, suivi des *Actinobacteria* (8 - 23%). Ce type de répartition a été observée dans la littérature pour des stations à boues activées (Albertsen *et al.* 2012; Guo and Zhang 2013). Les profils taxonomiques sont globalement stables en particulier pour les jours 14 et 28 et 112 et 119. Cette faible variabilité des profils au cours du temps avait été observée en FISH quantitatif par Mielczarek *et al.* (2013) lors d'un inventaire réalisé sur plusieurs stations. Ils avaient attribué cette faible variabilité aux faibles variations des conditions opératoires sur les stations d'épuration.

Dans le cadre de cette étude, quelques variations peuvent être tout de même observées notamment pour l'échantillon faisant suite à la période de surcharge hydraulique et organique (jour 42 – cf. paragraphe IV.2.2.).

Au jour 112, avant le démarrage de l'essai 2, la distribution taxonomique est comparable à celle des jours 14 et 28 avec un enrichissement en *Bacterioidetes* et un appauvrissement en *Nitrospirae*. Les conditions de fonctionnement durant la fin de l'essai 2 (jour 126) ont été favorables au *Micrococcales* (plus précisément *Tetrasphaera sp.*) et aux *Rhizobiales* par rapport aux autres espèces notamment aux *Bacteroidetes* (*Sphingobacteriales sp.*) et à la division TM7 (diminution de 64%). Les séquences les plus représentatives de la division TM7 ont été analysées avec l'outil BLAST de NCBI et correspondent à *Candidatus Saccharibacteria* (E-value <  $2 \cdot 10^{-115}$ , Query cover moyen de l'ordre de 100 % et un pourcentage d'identité d'au moins 84 %). Il n'a

pas été possible de confirmer ou non qu'il s'agissait d'une bactérie filamenteuse pouvant correspondre au Type 0041/0675.

La pression sélective observée lors de l'essai 2 pourrait résulter des conditions opératoires du procédé, notamment le changement du domaine de charge (charge massique de 0,06 au lieu de 0,10 – 0,13 kg DBO<sub>5</sub> (kg MVS)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> les périodes précédentes), éventuellement amplifié par l'ajout d'aluminium.

Cependant, d'après les analyses statistiques, la biodiversité des boues a été d'avantage impactée par les perturbations survenues lors de la période de surcharge que lors de l'essai 2 (Annexe 15). Les principales différences observées correspondent à des balances d'espèce au sein d'un même ordre tel que les *Shingobacteriales*, *Rhodocyclales*, les *Burkholderiales* et *Xanthomonadales*. Le facteur temps expliquerait 45 % de ces variations. En effet, 5 à 6 âges de boues séparent les groupes d'échantillon qui ont été définis par ces analyses.

En ce qui concerne *Candidatus Microthrix*, il est surtout présent aux jours 14, 28 et 112 (Figure V-12 et Annexe 15). Il contribue à expliquer les séparations entre les échantillons dans le plan de l'ACP étudié mais de façon plus atténuée que les autres OTU étant donné que son vecteur est un des plus courts. Sa proportion est d'avantage impactée par la surcharge hydraulique que par les perturbations survenues au cours de l'essai et/ou l'ajout de l'aluminium. Il est donc difficile de préciser l'impact de l'aluminium sur *Microthrix* par cette approche.

### V.3.1.1. Diversité des AOB pour des deux séries de mesure

La diversité des AOB a été étudiée pour l'ensemble du suivi AlCl<sub>3</sub> en DGGE. Les profils obtenus sont présentés en Figure V-13 avec un dendrogramme calculé avec le logiciel GelCompar II.

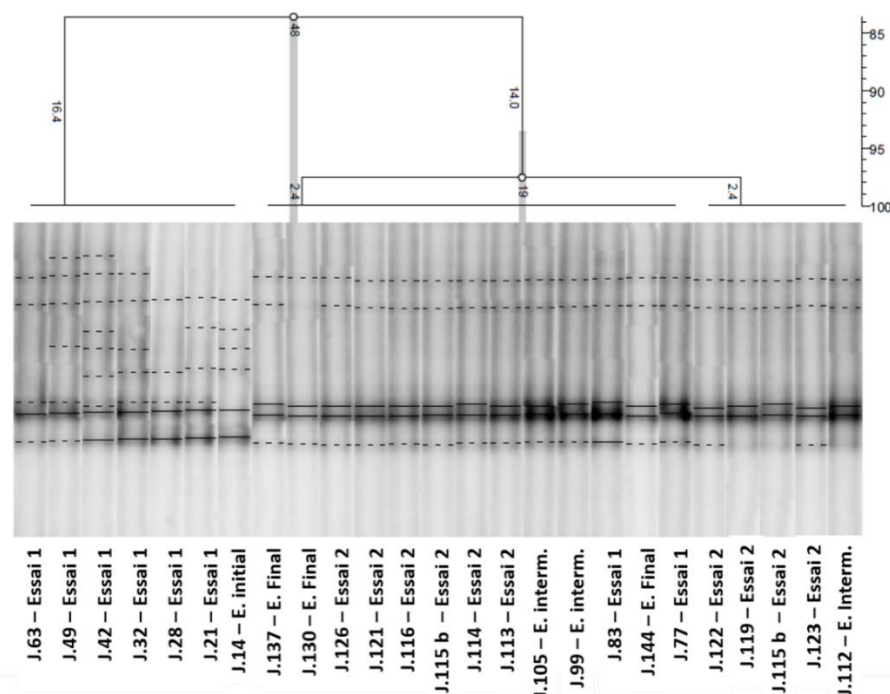


Figure V-13 : Gel DGGE avec calcul de dendrogramme par comparaison des bandes  
Les bandes majeures sont surlignées d'un trait continu et les bandes mineures en pointillés

La diversité des bandes DGGE obtenues pour les AOB est stable et faible avec seulement deux à trois bandes majeures observées sur les différents profils. Le dendrogramme a mis en évidence

deux groupes qui se caractérisent par des différences mineures. Elles correspondent davantage à une balance de dominance (intensité des bandes) qu'à l'apparition/disparition de bandes. Le basculement de cette dominance a eu lieu entre le jour 63 et le jour 77, ce qui ne correspond à aucun évènement majeur au niveau du fonctionnement du pilote. L'identification des bandes extraites a mis en évidence qu'il s'agit de *Nitrosomonas oligotropha* (E-value <  $1 \cdot 10^{-21}$ , Query cover moyen : 97% et un pourcentage d'identité d'au moins 95 %), en cohérence avec les résultats de l'inventaire moléculaire.

Une analyse DGGE a été également réalisée pour le suivi Al-Fe-Cl<sub>3</sub> et il n'a pas été observé d'impact significatif sur la biodiversité des AOB. L'identification des bandes majeurs a mis en évidence qu'il s'agissait également de *Nitrosomonas oligotropha*. D'après ces résultats, l'ajout de sels métalliques n'a pas d'impact majeur sur la biodiversité des AOB.

### V.3.2. Quantification des microorganismes d'intérêt par qPCR

#### V.3.2.1. Bactéries totales, *M. parvicella*, AOB et PAO

La quantité des bactéries totales, de *M. parvicella*, des PAO et des AOB a été déterminée par qPCR au cours des deux suivis. Les concentrations obtenues en nombre de copies par g d'échantillon de liqueur mixte sont représentées sur la Figure V-14 pour le suivi AlCl<sub>3</sub> et sur la Figure V-15 pour le suivi Al-Fe-Cl<sub>3</sub>.

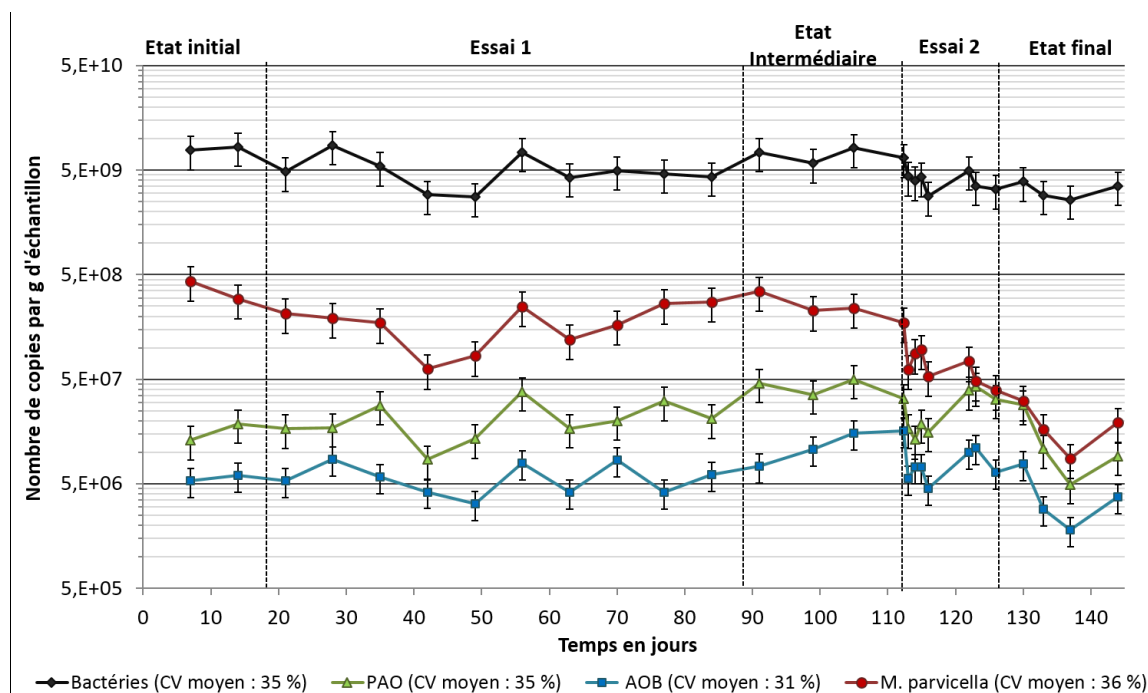


Figure V-14 : Quantification des microorganismes d'intérêt pour le suivi AlCl<sub>3</sub>

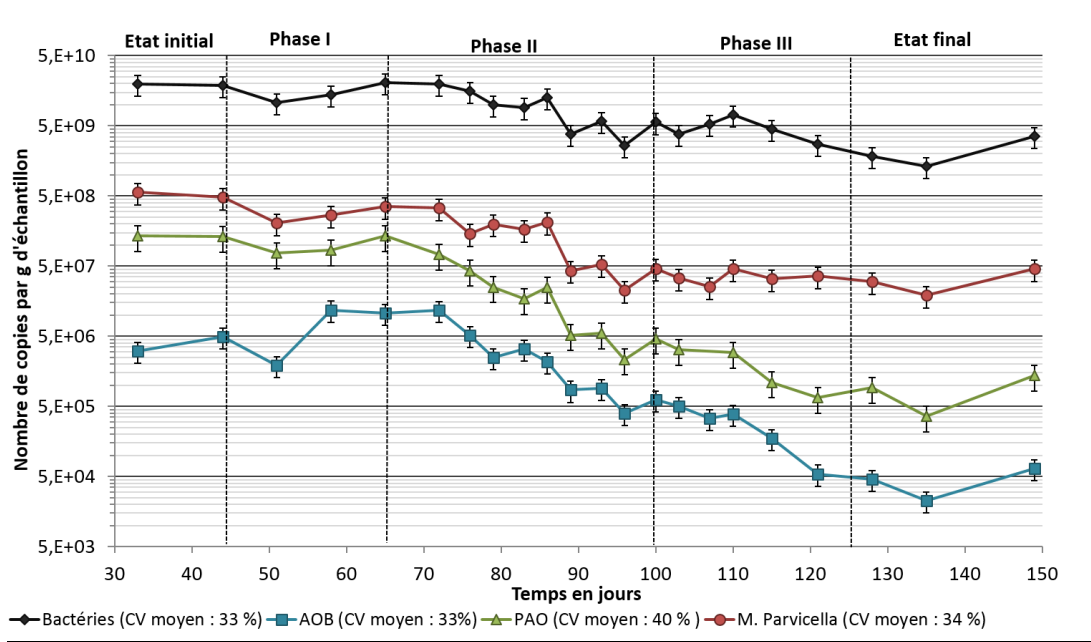


Figure V-15 : Quantification des microorganismes d'intérêt pour le suivi Al-Fe-Cl<sub>3</sub>

Avant l'ajout des sels métalliques, la concentration en bactéries est similaire pour les deux séries de mesure, excepté pour les PAO :

- La concentration en bactéries totales est comprise entre  $7,8 \times 10^9$  et  $2,0 \times 10^{10}$  copies g<sup>-1</sup> d'échantillon, valeurs comprises dans la gamme de celles disponibles dans la littérature pour des échantillons de boues activées traitant des eaux résiduaires urbaines ou industrielles (Dionisi *et al.* 2003; Harms *et al.* 2003).
- La concentration de *M. parvicella* est comprise entre  $2,9 \times 10^8$  et  $5,7 \times 10^8$  copies g<sup>-1</sup>. L'abondance relative du nombre de copies du gène de *M. parvicella* par rapport aux bactéries totales est de l'ordre de 3,5 %, valeurs cohérentes avec celles disponibles dans la littérature pour des stations rencontrant des problèmes de moussage ou de décantation (Kaetzke *et al.* 2005; Kumari *et al.* 2009).
- Les bactéries nitrifiantes sont en proportion moins nombreuses que les autres bactéries quantifiées. Leur concentration est comprise entre  $3,1 \times 10^6$  et  $6,0 \times 10^6$  copies g<sup>-1</sup>, en cohérence avec la large gamme obtenue par Estebanez (2011) pour des boues activées traitant différents effluents ( $7,7 \times 10^3$  et  $8,7 \times 10^7$  copies mL<sup>-1</sup>).
- En ce qui concerne les PAO, des différences au démarrage des essais entre les deux séries de mesure sont notables. La concentration obtenue pour le suivi AlCl<sub>3</sub> est de  $1,6 \times 10^7$  copies g<sup>-1</sup>, valeur moyenne significativement plus faible (1 Log) que celle obtenue pour le suivi Al-Fe-Cl<sub>3</sub> ( $1,3 \times 10^8$  copies g<sup>-1</sup>). Le fonctionnement du pilote avant le suivi AlCl<sub>3</sub> pourrait expliquer cette différence. En effet, des essais avaient été réalisés en dirigeant l'eau décantée vers le bassin endogène, pour favoriser la dénitrification. Ces essais ont impacté le développement des bactéries déphosphatantes. Les valeurs de concentration obtenues ( $< 1 \times 10^8$  copies (mg MVS)<sup>-1</sup> ou l'abondance relative ( $< 1$  % copies du gène) restent néanmoins dans la gamme inférieure des résultats bibliographiques (Fukushima *et al.* 2010; He *et al.* 2007), en lien avec la faible concentration en orthophosphates de l'influent de l'installation.

Pour l'ensemble de ces essais, et en particulier le suivi  $\text{AlCl}_3$ , l'impact des sels métalliques sur la quantité de bactéries dans les bassins est difficile à dissocier de celui du fonctionnement du pilote. Les données de quantification ont donc été comparées aux simulations de la croissance des biomasses réalisées pour le suivi  $\text{AlCl}_3$ . La comparaison de ces résultats est discutée dans les paragraphes suivants.

### V.3.2.2. Production de biomasse - Suivi $\text{AlCl}_3$

La Figure V-16 présente les évolutions de biomasse simulées à l'aide du modèle développé pour le pilote (cf. paragraphe IV.2.3) pour le suivi  $\text{AlCl}_3$ .

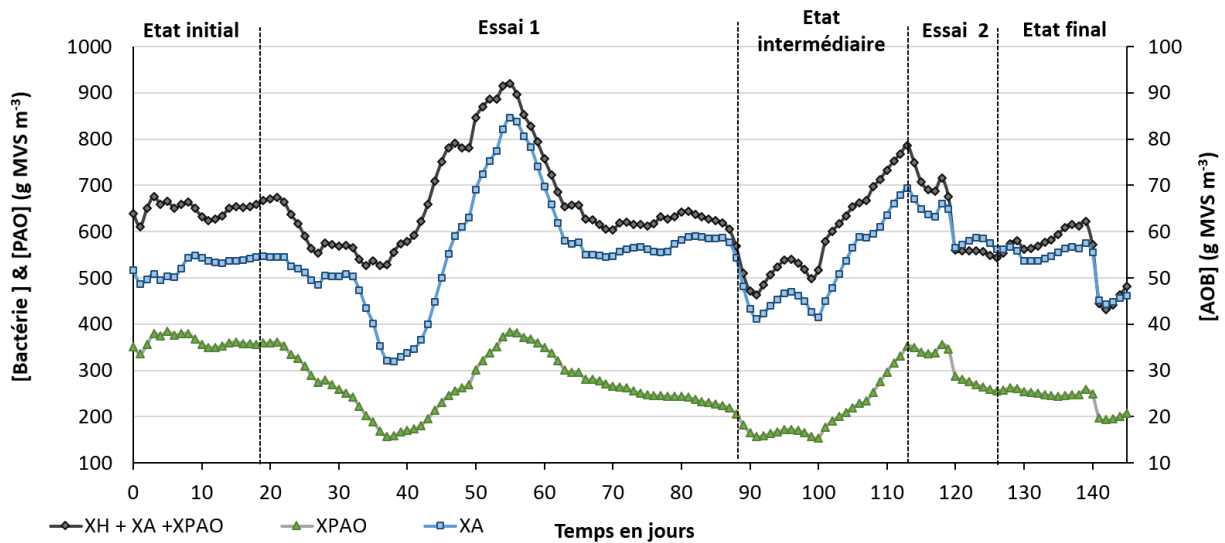


Figure V-16 : Modélisation de la biomasse totale ( $XH + XA + XPAO$ ), autotrophe ( $XA$ ) et déphosphatante ( $XPAO$ )

Sur cette figure comme sur la précédente présentant la quantification de la biomasse, différentes variations sont observées et peuvent être associées au fonctionnement du pilote. La période de surcharges (jours 35 à 42) a notamment induit une diminution significative de la concentration en PAO et en *M. parvicella* quantifiée, de l'ordre de 65 à 70 %. Le premier arrêt des extractions des boues a permis une augmentation significative de l'ensemble des populations notamment des PAO avec une augmentation de l'ordre de 350 % du jour 42 à 56 (Figure V-14). La reprise des extractions a induit une diminution de l'ordre de 50 % du jour 56 à 63 pour l'ensemble des populations (Figure V-14).

Afin de dissocier l'impact de l'aluminium sur les populations d'intérêt de l'impact du fonctionnement du pilote, les données de quantification ont été comparées aux résultats obtenus en modélisation. Pour cela, la production de biomasse a été calculée comme suit :

$$Pn_i = \frac{\Delta B_i}{J_{n+i} - J_n} \times V + \phi B_{Ext.i}$$

Équation V-1

Avec :

$P_{n,i}$  : production de la biomasse pour la période  $i$  ;

$\Delta B_i$  : différence de biomasse entre le jour  $J_n$  et  $J_{n+i}$  mesurée en qPCR (nombre de copie par gramme d'échantillon) ou modélisée (g MVS  $m^{-3}$ ) ;

$V$  : volume du bioréacteur ;

$\phi B_{Ext.i}$  : Flux de biomasse extrait sur la période  $i$ , calculé suivant l'Équation V-2.

$$\phi B_{Ext.i} = \frac{[B]_{LM,i}}{[MVS]_{LM,i}} \times (\phi MVS_{Ext,i} + \phi MVS_{Eff,i})$$

Équation V-2

Avec :

$[B]_{LM,i}$  : concentration moyenne en biomasse analysée ou modélisée dans les liqueurs mixtes sur la période  $i$  ;

$[MVS]_{LM,i}$  : concentrations moyennes en MVS dans les liqueurs mixtes ;

$\phi MVS_{Ext,i}$  et  $\phi MVS_{Eff,i}$  : flux moyen de MES dans l'extraction (boues et flottants) et dans l'effluent sur la période  $i$ .

#### V.3.2.2.1. Impact de l'aluminium sur la production de bactéries totales

Les données de quantification (bactéries totales en nombre de copies par milli litre de liqueur mixte en faisant l'hypothèse que la densité de la liqueur est égale à celle de l'eau) ont été comparées aux résultats obtenus en modélisation (somme des biomasses en g MVS par litre de liqueur mixte). Pour représenter graphiquement les résultats, les données de production ont été centrées et réduites (Figure V-17).

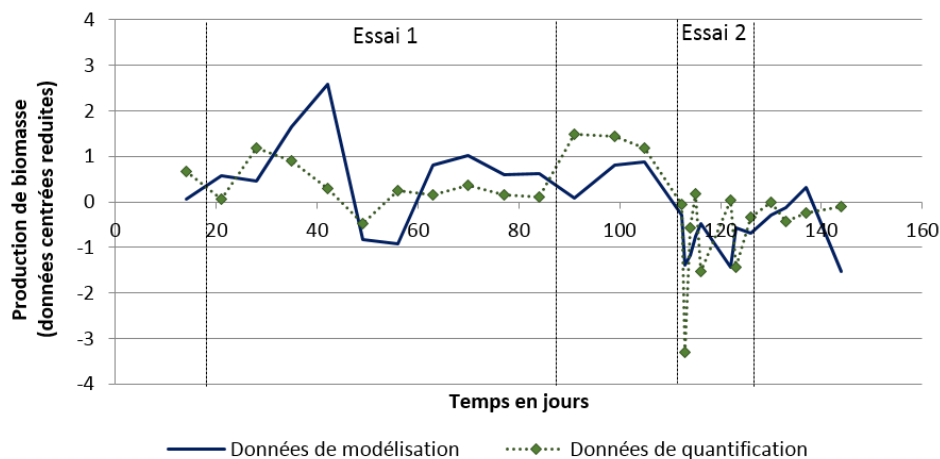


Figure V-17 : Comparaison des productions de bactéries totales par qPCR et par modélisation

La production de biomasse selon les données de modélisation et de quantification évolue suivant la même tendance, excepté le premier jour de l'essai 2. En excluant ce point, le coefficient de Pearson entre la production de biomasse modélisée et quantifiée est de 0,46 avec une probabilité critique ( $p$ ) de 0,02. La corrélation entre les données est faible mais statistiquement significative.

La Figure V-18 présente les données de production de biomasse totale calculées selon l'Équation V-2.

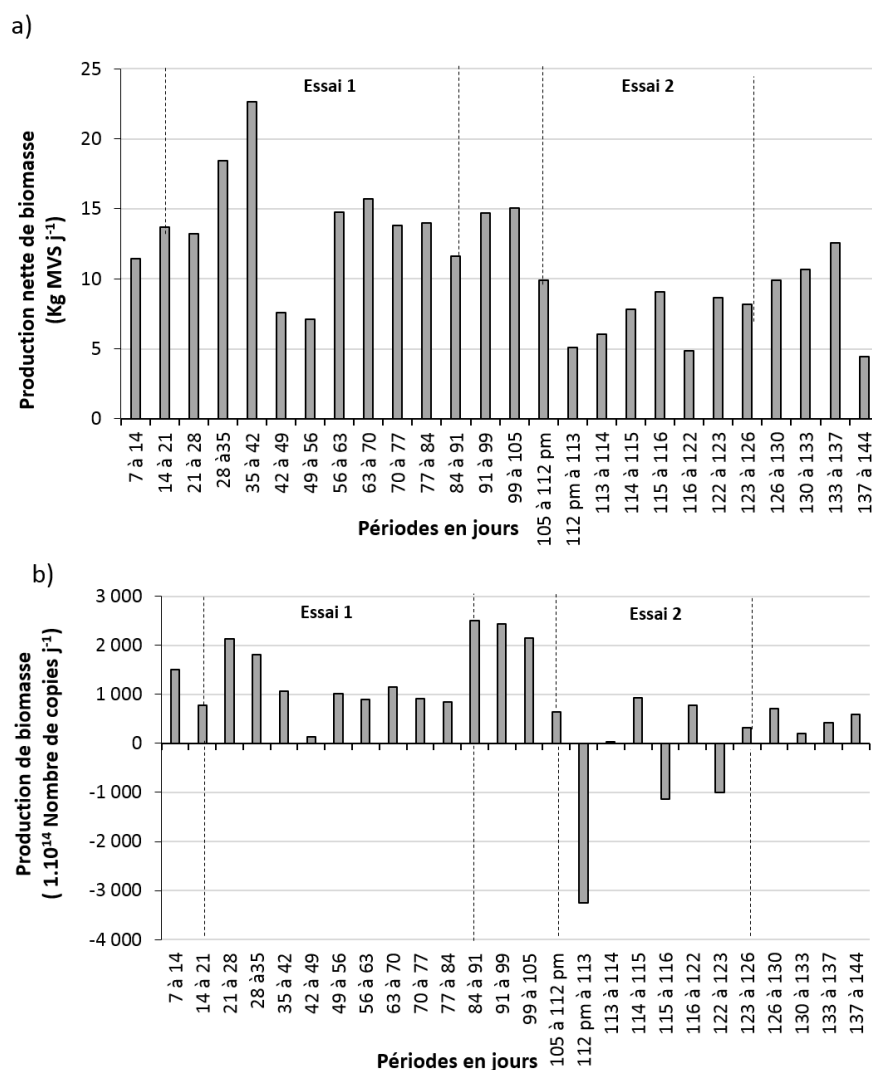


Figure V-18 : Production de bactéries totales déterminée par modélisation (a) et par qPCR (b)

D'après les données de simulation, la production nette de biomasse est toujours positive, puisqu'aucun phénomène d'inhibition ou de modification du décès de la biomasse n'a été modélisé. Les variations de production sont liées à la période de surcharge (jours 35 à 42) et aux évolutions de la charge admise sur l'étage biologique du pilote.

La production de biomasse suivie par qPCR indique *a contrario* une perte de biomasse totale importante le premier jour de l'essai 2, puis une croissance moyenne nulle tout au long de cet essai. L'ajout d'aluminium à une dose de 137 mmol Al (kg MES)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> aurait un effet négatif sur une portion de la biomasse totale des boues activées, voire biocide au moment de l'ajout. La production de biomasse redevient positive après l'arrêt des ajouts.



### V.3.2.2.2. Impact de l'aluminium sur les bactéries nitrifiantes et déphosphatantes

Les évolutions de la production des biomasses autotrophes et déphosphatantes à partir des données de quantification sont décrites sur la Figure V-19.

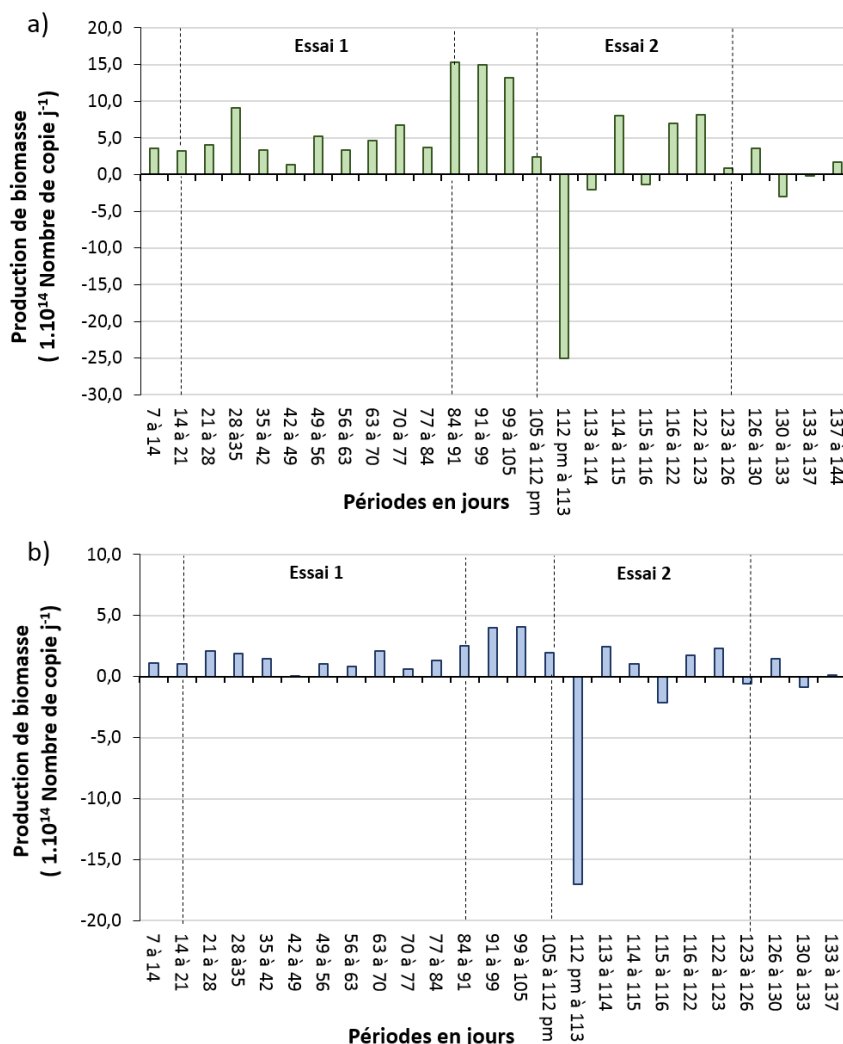


Figure V-19 : Production de biomasse déphosphatante (a) et autotrophe (b) selon les données de quantification - Suivi  $\text{AlCl}_3$

Comme pour les bactéries totales, l'ajout d'aluminium aurait un effet biocide au démarrage de l'essai. La production déterminée par quantification des bactéries est ensuite en moyenne légèrement positive, et les concentrations en AOB et PAO (en absolu et en relatif) augmentent malgré des concentrations en aluminium de l'ordre de  $1,2 \text{ mmol (g MVS)}^{-1}$ . A cette concentration, l'impact sur la croissance de ces bactéries serait donc limité.

### V.3.2.2.3. Impact de l'ajout d'aluminium sur *M. parvicella*

La Figure V-20.a présente l'évolution de la concentration de *M. parvicella* en nombre de copies par  $\mu\text{g}$  d'ADN qui, comme indiqué au paragraphe IV.3.2.2, reflète l'évolution de sa proportion par rapport à la biomasse totale (eucaryote et procaryote). La courbe présentant les concentrations des AOB et des PAO est également reportée sur cette figure.

La production de biomasse correspondant à *M. parvicella* déterminée à partir des données de quantification est présentée sur la Figure V-20.b.

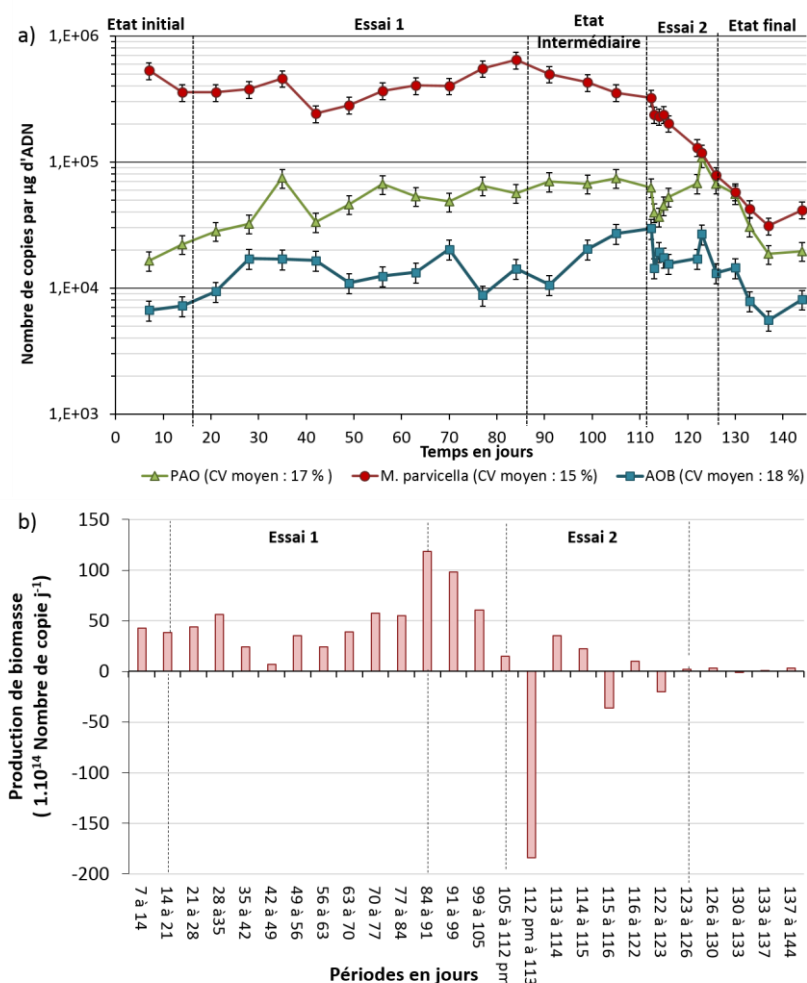


Figure V-20 : Abondance relative de *M. parvicella*, des AOB et des PAO (a) et Production de biomasse correspondant à *M. parvicella* - Suivi  $\text{AlCl}_3$

Les évolutions de *M. parvicella* présentent quelques différences par rapport aux autres bactéries quantifiées :

- Lors de l'essai 1, son abondance relative semble augmenter après une courte phase de diminution de la production lors de la période de surcharges (jours 35 à 42).
- A l'état intermédiaire, après une croissance relativement importante après l'arrêt des ajouts de sels d'aluminium, la production de biomasse diminue. Les conditions ont donc été moins favorables à *M. parvicella* qu'aux autres populations durant cette période. Ceci ne peut être attribué à un effet de l'aluminium dont la concentration était en moyenne de  $0,3 \text{ mmol (g MVS)}^{-1}$  dans les liqueurs mixtes. Il est possible que cette décroissance soit liée à l'évolution de la température (shift saisonnier). Zhang *et al.* (2010) avaient observé le même phénomène pour des températures comprises entre  $17^\circ\text{C}$  et  $19^\circ\text{C}$ . Avec l'augmentation de la température le substrat préférentiel de *M. parvicella* est de plus en

plus soluble, rendant *M. parvicella* de moins en moins compétitif vis-à-vis du substrat par rapport aux autres bactéries hétérotrophes.

- Lors de l'essai 2, l'abondance relative en *M. parvicella* décroît, indiquant un impact plus important de l'aluminium sur cette population que pour les autres bactéries.

### V.3.2.1. Comparaison avec les résultats obtenus lors du suivi Al-Fe-Cl<sub>3</sub>

Les productions de biomasse pour *M. parvicella* et pour les bactéries totales ont été calculées suivant la même méthode que précédemment pour le suivi Al-Fe-Cl<sub>3</sub>. Les résultats sont présentés sur la Figure V-21.

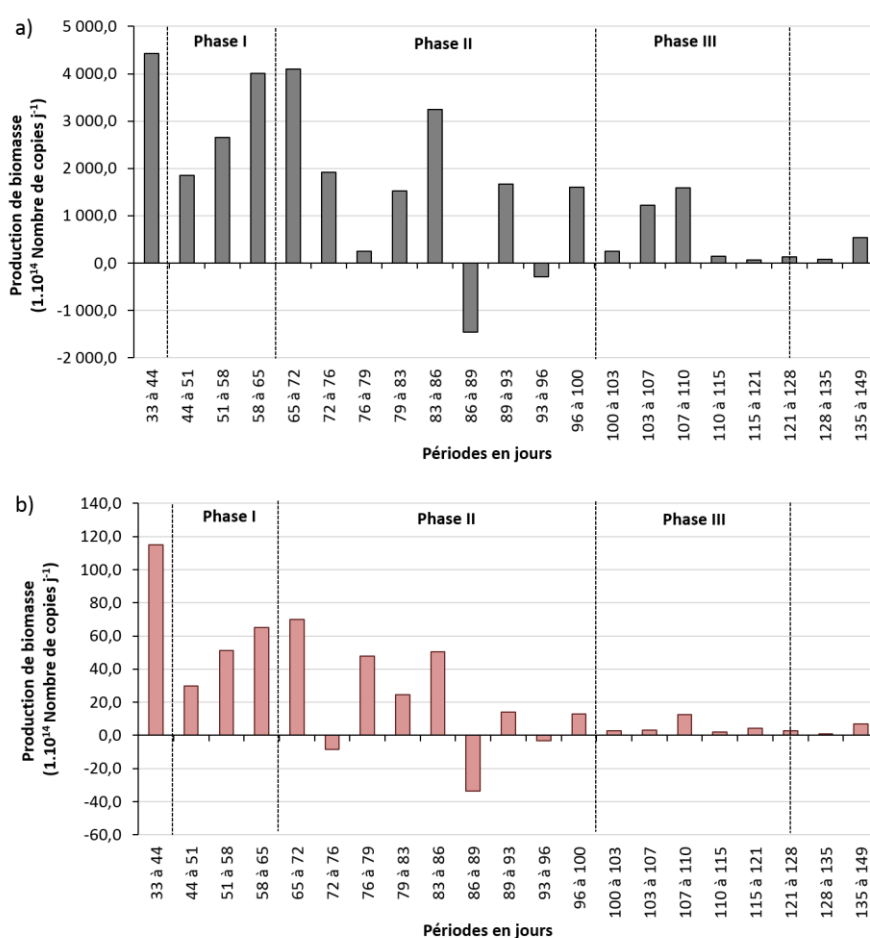


Figure V-21 : Production de biomasse correspondant aux bactéries totales (a) et à *M. parvicella* (b) - suivi Al-Fe-Cl<sub>3</sub>

Comme pour le suivi AlCl<sub>3</sub>, l'ajout de sels métalliques conduisant à une concentration en métaux dans la liqueur mixte comprise entre 0,6 et 1,3 mmol Me (g MVS)<sup>-1</sup> impacte négativement la production de la biomasse totale et de *M. parvicella*.

La concentration de *M. parvicella* (copies g<sup>-1</sup>) et son abondance relative en nombre de copies par µg d'ADN sont présentées sur la Figure V-22.

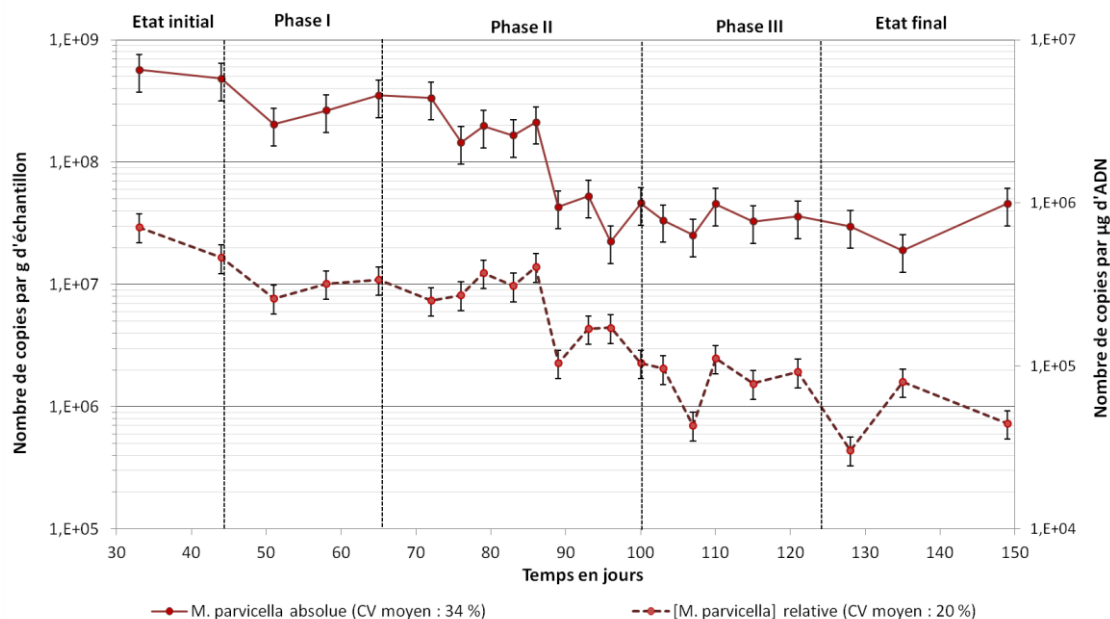


Figure V-22 : Quantification de *M. parvicella* pour le suivi Al-Fe-Cl<sub>3</sub>

L'ajout de sels métalliques induisant une concentration dans la liqueur mixte inférieure à 0,6 mmol Me (g MVS)<sup>-1</sup> n'a pas d'effet significatif sur *M. parvicella*. Sa concentration et son abondance relative diminuent pour des doses supérieures (phase II). Lors de la phase III, ces valeurs se stabilisent, alors que la concentration en bactéries totales diminue légèrement (Figure V-15).

### V.3.2.2. Relation Indice de boues – Abondance de *M. parvicella*

La Figure V-23 présente l'évolution de l'indice de boues en fonction de l'abondance relative de *M. parvicella*.

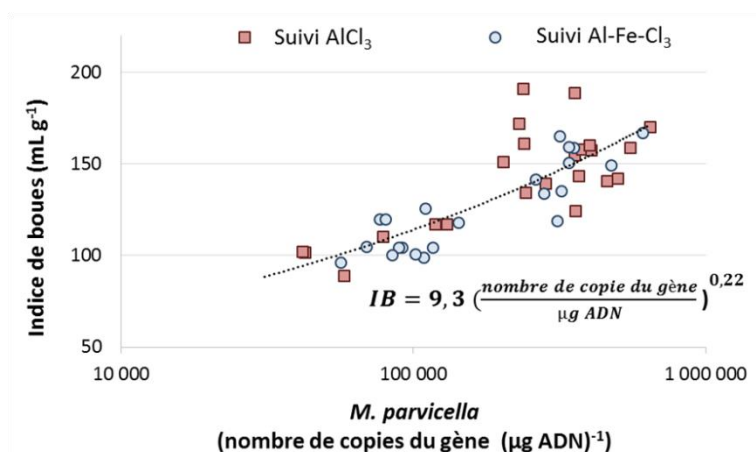


Figure V-23 : Indice de boues en fonction du nombre de copies de *M. parvicella* par µg d'ADN – Ensemble des mesures

En plus de la modification de la morphologie des agrégats biologiques en partie due à l'internalisation de *M. parvicella*, la diminution de l'indice de boues est corrélée à la diminution de la quantité de *M. parvicella* confirmant ainsi les appréciations visuelles réalisées en microscopie (cf. paragraphe V.2.1).

### V.3.2.3. Discussion

L'ajout d'aluminium à une dose comprise entre 15 et 40 mmol Al (kg MES)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> a peu d'impact sur la production des biomasses bactériennes quantifiées en qPCR. A ce dosage, correspondant à une concentration dans la liqueur mixte inférieure à 0,6 mmol (g MVS)<sup>-1</sup>, la formation de mousse est limitée et l'indice de boues est stabilisé, en lien avec une légère modification de la morphologie des agrégats biologiques. Le maintien des indices de boues serait donc lié à des phénomènes de coagulation n'impactant pas significativement la morphologie des agrégats et l'abondance de *M. parvicella*.

À une dose plus importante, ( $\approx 140$  mmol Al (kg MES)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>), correspondant à une concentration dans la liqueur mixte comprise entre 0,7 et 1,4 mmol (g MVS)<sup>-1</sup>, l'indice de boues diminue rapidement ( $-7$  à  $-10$  mL g<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>) et les mousses disparaissent en un jour. L'abondance relative de *M. parvicella* décroît, indiquant un impact plus important de l'aluminium sur cette population que sur les autres bactéries. Ceci est associé à une internalisation des bactéries filamenteuses et à leur disparition du liquide interstitiel ainsi qu'à une modification significative de la morphologie des agrégats biologiques. De diffus avant les ajouts, ils sont devenus plus compacts et plus denses en quelques jours de traitement.

A ce dosage, il a été également observé un effet négatif des sels d'aluminium sur la croissance de l'ensemble des populations étudiées, voire biocide le premier jour de l'essai. Lorsque cette concentration est atteinte à l'aide d'un dosage progressif, aucun effet biocide n'est observé, même si la croissance bactérienne semble être également limitée.

À l'arrêt des ajouts, cette limitation semble perdurer notamment pour les AOB et les PAO. Le rendement de déphosphatation chute, alors que la déphosphatation biologique était particulièrement efficace avant les périodes de dosage. Cette chute s'expliquerait par la perte de biomasses déphosphatantes observée en qPCR notamment pour le dosage progressif.

L'ajout de sels métalliques contribue donc à rendre *M. parvicella* moins compétitif que les autres bactéries pour des concentrations supérieures à 0,7 mmol (g MVS)<sup>-1</sup> dans les liqueurs mixtes, mais n'aurait pas d'impact significatif sur cette bactérie pour des concentrations inférieures ou égales à cette valeur.

D'un point de vue opérationnel, les conclusions précédentes conduisent aux préconisations suivantes lors de l'utilisation de sels métalliques :

- **Un dosage préventif**

Le maintien d'une concentration de l'ordre de 0,6 mmol (g MVS)<sup>-1</sup> dans les liqueurs mixtes permettrait une stabilisation de l'indice de boues ainsi qu'une disparition progressive des mousses présentes en surface des bassins biologiques. Ce traitement ne permettrait pas de réduire l'abondance relative de *M. parvicella* mais de limiter l'ouverture des agrégats biologiques. Ce type de dosage, compatible avec une déphosphatation physico-chimique partielle, pourrait être appliqué en prévention des dysfonctionnements biologiques sur les installations rencontrant des épisodes de foisonnement saisonniers.

- **Un dosage progressif sur plusieurs semaines**

Ce type de dosage permettrait une disparition progressive des mousses ainsi qu'une diminution de l'indice de boues (valeurs inférieures à  $110 \text{ mL g}^{-1}$  en 8 semaines dans la présente étude). Cette amélioration des conditions de décantation serait obtenue pour une concentration supérieure à  $0,7 \text{ mmol Me (g MVS)}^{-1}$  dans les liqueurs mixtes.

Cette stratégie est préférable à un dosage « choc » dont l'impact sur les bactéries pourrait conduire à une dégradation des performances de traitement.

## Conclusion générale

---

La majorité du parc des stations d'épuration en France fonctionne selon le principe des boues activées. Ces installations peuvent être sujettes à des dysfonctionnements biologiques induits par la prolifération excessive de bactéries filamenteuses qu'il convient de contrôler pour garantir leurs performances.

Ce travail a eu pour objectif d'étudier une des stratégies de lutte contre le foisonnement des boues : l'ajout de sels métalliques. Il s'agissait d'évaluer l'efficacité de cette méthode pour l'amélioration des conditions de décantation, la spécificité du traitement notamment vis-à-vis du principal filament mis en cause (*Microthrix parvicella*) et son impact sur les micro-organismes des boues activées.

Pour atteindre ces objectifs, la démarche expérimentale adoptée a consisté à analyser le fonctionnement d'un pilote semi-industriel (1500 EH) soumis à des dysfonctionnements biologiques traités par ajout de sels métalliques, à l'aide de différents outils du génie des procédés (étude des performances épuratoires de l'installation, modélisation du fonctionnement du pilote) et du génie microbiologique (microscopie, qPCR, DGGE, inventaire moléculaire). Deux suivis de 6 mois chacun ont été réalisés. Ils ont différé par le type de sels métalliques ajoutés (aluminium ou fer + aluminium) et par les doses appliqués.

En parallèle, une enquête à l'échelle nationale a été réalisée auprès des exploitants des stations d'épuration afin de recenser les solutions mises en place pour pallier ces dysfonctionnements ainsi qu'actualiser les données concernant leur occurrence.

L'étude bibliographique a mis en évidence que *M. parvicella* pouvait s'adapter aux différentes conditions opératoires des systèmes à boues activées grâce à un métabolisme versatile. L'ajout d'aluminium permettrait un contrôle du foisonnement dû à *M. parvicella* en limitant l'accès à son substrat préférentiel par divers mécanismes.

D'après l'enquête réalisée auprès de 370 stations d'épuration, les problèmes de décantation demeurent une problématique majeure pour 30 % des installations à boues activées faible charge et/ou aération prolongée de taille inférieure à 250 000 EH, et pour 50 % de celles traitant plus de 250 000 EH. Au moins un dysfonctionnement sur trois serait dû à un développement excessif de bactéries filamenteuses. Un taux de charge organique élevé a été identifié comme l'un des facteurs favorisant les dysfonctionnements. L'ajout de sels métalliques pour la précipitation du phosphore contribue quant à elle à diminuer l'occurrence des dysfonctionnements, sachant que des sels de fer sont majoritairement utilisés.

L'analyse du fonctionnement du pilote au cours des essais a nécessité l'application d'une procédure de consolidation des données de fonctionnement de l'installation. Celle-ci a permis d'identifier d'éventuelles valeurs aberrantes et de les écarter des jeux de données finaux. Les données consolidées ont pu ensuite être utilisées pour comprendre et caractériser le fonctionnement du pilote, en termes d'évolution des masses de boues notamment.

Les données de quantification des biomasses obtenues par qPCR ont également fait l'objet d'une analyse systématique, afin de s'assurer que les résultats représentent bien les événements survenus et ne sont pas dus à des artéfacts d'analyses. L'étude des incertitudes introduites lors des différentes étapes de la méthodologie employée ont là aussi conduit à l'élimination de valeurs aberrantes. Cette analyse a également permis de choisir la manière d'exprimer les



résultats obtenus. Ils sont exprimés en nombre de copies du gène par gramme d'échantillon afin de suivre l'évolution de la concentration des populations d'intérêt. Leur abondance relative par rapport à l'ensemble de la biomasse, eucaryote et procaryote, est suivie en exprimant les résultats en nombre de copies du gène par microgramme d'ADN.

Les mesures réalisées sur le pilote semi-industriel lors d'épisodes de foisonnement ont confirmé l'efficacité des sels métalliques pour contrôler la capacité de décantation des boues activées, limiter les pertes de boues et la formation de flottants, pouvant entraîner une altération des rendements épuratoires. Selon la dose appliquée différentes stratégies de traitements peuvent être mise en œuvre.

Les principales conclusions sont les suivantes :

- Lorsque la concentration dans la liqueur mixte est comprise entre 0,3 et 0,6 mmol (g MVS)<sup>-1</sup>, la formation de mousses est limitée et l'indice de boues est stabilisé, grâce à des phénomènes de coagulation qui impactent peu la morphologie des agrégats et l'abondance relative de *M. parvicella*.
- À une dose plus importante, correspondant à une concentration comprise entre 0,7 et 1,4 mmol (g MVS)<sup>-1</sup>, l'ajout de sels d'aluminium a un effet négatif sur la croissance des populations étudiées, voire biocide le premier jour des ajouts lorsque la dose n'est pas appliquée de manière progressive. L'ajout d'une dose de l'ordre de 140 mmol (kg MES)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>, permet une diminution rapide de l'indice de boues ainsi qu'une disparition des mousses en un jour. L'abondance relative de *M. parvicella* décroît. La compaction des agrégats et l'internalisation des bactéries filamenteuses pourraient conduire à une limitation de croissance notamment de *M. parvicella*, par diminution de son accès au substrat. Par contre, aucun impact sur la biodiversité des boues ni sur celle des AOB n'a été noté.
- Les rendements d'abattement de dépollution pour les paramètres MES, DCO et NTK sont légèrement améliorés lors des ajouts, en lien avec la diminution de matières en suspension en sortie du clarificateur. Les rendements de déphosphatation sont plus significativement augmentés, notamment pour les doses testées les plus élevées correspondant à des ratios molaires bien supérieurs aux valeurs nécessaires à l'abattement du phosphore par voie physico-chimique. A ces fortes doses, la limitation de croissance des PAO (par diminution des orthophosphates et/ou par augmentation des gradients de concentration), également observée en qPCR, pourrait expliquer la chute des rendements de déphosphatation après l'arrêt des injections.

L'ajout de sels métalliques contribue donc à former des agrégats biologiques denses, plus aptes à décanter, à une internalisation des bactéries filamenteuses et à leur disparition du liquide interstitiel. D'après ces éléments, les mécanismes impliqués dans l'amélioration des conditions de décantation s'apparentent à des mécanismes non spécifiques de coagulation-floculation.

De plus, l'ajout de sels métalliques rendrait *M. parvicella* moins compétitif que les autres bactéries pour des concentrations supérieures à 0,7 mmol (g MVS)<sup>-1</sup> dans les liqueurs mixtes. En effet, l'ajout des sels métalliques induirait une limitation de la croissance de *M. parvicella* en limitant notamment son accès au substrat.

Afin de préciser ces hypothèses, il serait pertinent de poursuivre l'analyse des résultats à l'aide des outils de modélisation. Il faudrait tout d'abord inclure une biomasse supplémentaire représentant *M. parvicella*. Cette modification permettrait notamment une meilleure évaluation de l'impact de la température dans l'interprétation des résultats obtenus. Elle permettrait également de mieux comprendre les phénomènes de compétition entre les bactéries filamenteuses et les bactéries du floc.

Afin de représenter l'impact de la modification de la structure des agrégats sur la diffusion du substrat, il pourrait être intéressant également de ne plus considérer les agrégats biologiques comme un biofilm homogène en utilisant des modèles numériques du type 1-D voire 2-D.

Avant d'apporter une telle modification à la structure du modèle, une modification de certains paramètres biocinétiques peut être envisagée afin d'apporter quelques éléments de discussions complémentaires. Par exemple, un ajustement des constantes d'affinité des bactéries vis-à-vis du substrat (organique et de l'oxygène) permettrait de représenter de manière simplifiée une modification des gradients de concentration et d'en étudier l'impact sur les vitesses de réactions. Le jeu de données validées obtenu dans le cadre de ces travaux de recherche en utilisant à la fois des outils du génie du procédé et microbiologique, constitue également un ensemble particulièrement intéressant pour améliorer la modélisation d'autres processus comme ceux relatifs à la déphosphatation combinant les voies biologique et physico-chimique.

Afin d'aller plus loin dans la définition de stratégie de contrôle adaptées, il serait pertinent d'évaluer l'efficacité d'un traitement à base de chlorures de fer seuls pour le contrôle du foisonnement des boues. En effet, les mesures ont été réalisées avec des solutions contenant majoritairement des sels d'aluminium et d'après l'enquête réalisée, les exploitants utilisent majoritairement des sels de fer. Bien que l'efficacité des sels de fer soit discutable d'après la littérature, si les mécanismes reposent essentiellement sur des phénomènes de coagulation, les sels de fer devraient également être efficaces pour le contrôle du foisonnement des boues. Cette hypothèse est renforcée par les résultats de l'enquête qui montre une diminution significative de l'occurrence des dysfonctionnements avec le traitement du phosphore (majoritairement à base de sels de fer).

Ces travaux ont également mis en évidence que l'action de l'aluminium sur *M. parvicella* serait indirecte et résulterait, aux doses testées, d'une perte de compétitivité due à une limitation de l'accès au substrat. L'internalisation des bactéries filamenteuses n'étant pas forcément un phénomène spécifique à *M. parvicella*, il est possible que suivant la composition de leur structure externe, d'autres bactéries filamenteuses soient également affectées. Par conséquent, l'ajout des sels métalliques pourrait être efficace pour lutter contre le foisonnement dû à d'autres bactéries filamenteuses que *M. parvicella*. Il serait donc intéressant d'appliquer la méthodologie développée dans cette étude pour étudier le contrôle du foisonnement induit par d'autres types de bactéries filamenteuses.

## Références bibliographiques

---

- Adamczyk, J., M. Hesselsoe, N. Iversen, M. Horn, A. Lehner, P. H. Nielsen, M. Schlöter, P. Roslev and M. Wagner (2003). "The isotope array, a new tool that employs substrate-mediated labeling of rRNA for determination of microbial community structure and function." *Applied and Environmental Microbiology* 69(11): 6875-6887.
- Agriodiotis, V., C. F. Forster and C. Carliell-Marquet (2007). "Addition of Al and Fe salts during treatment of paper mill effluents to improve activated sludge settlement characteristics." *Bioresource Technology* 98(15): 2926-2934.
- Albertsen, M., L. B. S. Hansen, A. M. Saunders, P. H. Nielsen and K. L. Nielsen (2012). "A metagenome of a full-scale microbial community carrying out enhanced biological phosphorus removal." *Isme Journal* 6(6): 1094-1106.
- Ali, I., H. Khararjian and M. Ahmed (1985). "VIABILITY OF MICROBIAL MASS IN COMPARTMENTALIZED SINGLE ACTIVATED-SLUDGE PROCESS." *Water Research* 19(7): 927-932.
- Amann, R. I., W. Ludwig and K. H. Schleifer (1995). "Phylogenetic identification and in-situ detection of individual microbial-cells without cultivation " *Microbiological Reviews* 59(1): 143-169.
- Andreasen, K. and P. H. Nielsen (1998). "In situ characterization of substrate uptake by *Microthrix parvicella* using microautoradiography." *Water Science and Technology* 37(4-5): 19-26.
- Andreasen, K. and P. H. Nielsen (2000). "Growth of *Microthrix parvicella* in nutrient removal activated sludge plants: Studies of in situ physiology." *Water Research* 34(5): 1559-1569.
- Ardilly, P. (2006). *Les techniques de sondage*, Editions Technip.
- ATV (1989). Report : prevention and control of bulking sludge and scum. *Korr. Abwass*, ATV Working Group 2.6.1. 36: 165.
- BDERU (2012). *La Base de Données Eaux Résiduares Urbaines 2012*
- Bidault, A., F. Clauss, D. Helaine and C. Balavoine (1997). "Floc agglomeration and structuration by a specific talc mineral composition." *Water Science and Technology* 36(4): 57-68.
- Björnsson, L., P. Hugenholtz, G. W. Tyson and L. L. Blackall (2002). "Filamentous Chloroflexi (green non-sulfur bacteria) are abundant in wastewater treatment processes with biological nutrient removal." *Microbiology-Sgm* 148: 2309-2318.
- Bushon, R., C. M. Kephart, G. F. Koltun, D. Francy, F. W. Schaefer and H. D. A. Lindquist (2010). "Statistical assessment of DNA extraction reagent lot variability in real-time quantitative PCR." *Letters in Applied Microbiology* 50(3): 276-282.
- Buzier, R., M. H. Tusseau-Vuillemin, M. Keirsbulck and J. M. Mouchel (2011). "Inputs of total and labile trace metals from wastewater treatment plants effluents to the Seine River." *Physics and Chemistry of the Earth* 36(12): 500-505.
- Canler, J. P. (2005). FNDAE n°33 : Dysfonctionnements des stations d'épuration : origines et solutions, CEMAGREF: 63.
- Canler, J. P. and L. Julien (2010). Efficacité des principaux produits envisageables pour améliorer la décantabilité de la boue en cas de crise aiguë de foisonnement. *Journées Inforamtion Eaux*. Poitiers: 15.
- Caporaso, J. G., K. Bittinger, F. D. Bushman, T. Z. DeSantis, G. L. Andersen and R. Knight (2010). "PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment." *Bioinformatics* 26(2): 266-267.

- Caporaso, J. G., J. Kuczynski, J. Stombaugh, K. Bittinger, F. D. Bushman, E. K. Costello, N. Fierer, A. G. Pena, J. K. Goodrich, J. I. Gordon, G. A. Huttley, S. T. Kelley, D. Knights, J. E. Koenig, R. E. Ley, C. A. Lozupone, D. McDonald, B. D. Muegge, M. Pirrung, J. Reeder, J. R. Sevinsky, P. J. Tumbaugh, W. A. Walters, J. Widmann, T. Yatsunenko, J. Zaneveld and R. Knight (2010). "QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data." *Nature Methods* 7(5): 335-336.
- Casellas, M. (2002). *Mise en oeuvre, modélisation, optimisation et contrôle d'un procédé discontinu séquentiel (SBR)*. Département de Génie Biochimique et Alimentaire, Université de Limoges: 313.p.
- Chao, A. (1987). "ESTIMATING THE POPULATION-SIZE FOR CAPTURE RECAPTURE DATA WITH UNEQUAL CATCHABILITY." *Biometrics* 43(4): 783-791.
- Choubert, J. M., A. Marquot, A. E. Stricker, Y. Racault, S. Gillot and A. Heduit (2009). "Anoxic and aerobic values for the yield coefficient of the heterotrophic biomass: Determination at full-scale plants and consequences on simulations." *Water Sa* 35(1): 103-109.
- Choubert, J. M., M. Pomies, S. M. Ruel and M. Coquery (2011). "Influent concentrations and removal performances of metals through municipal wastewater treatment processes." *Water Science and Technology* 63(9): 1967-1973.
- Clauss, F., D. Helaine, C. Balavoine and A. Bidault (1998). "Improving activated sludge floc structure and aggregation for enhanced settling and thickening performances." *Water Science and Technology* 38(8-9): 35-44.
- Cole, J. R., Q. Wang, E. Cardenas, J. Fish, B. Chai, R. J. Farris, A. S. Kulam-Syed-Mohideen, D. M. McGarrell, T. Marsh, G. M. Garrity and J. M. Tiedje (2009). "The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis." *Nucleic Acids Research* 37: D141-D145.
- Cornillon, P. A., A. Guyader, F. Husson, N. Jégou, J. Josse, M. Kloareg, E. Martzner-Lober and L. Rouvière (2012). *Statistiques avec R - 3<sup>e</sup> édition revue et augmentée*, Presses Universitaires de Rennes.
- Crocetti, G. R., P. Hugenholtz, P. L. Bond, A. Schuler, J. Keller, D. Jenkins and L. L. Blackall (2000). "Identification of polyphosphate-accumulating organisms and design of 16S rRNA-directed probes for their detection and quantitation." *Applied and Environmental Microbiology* 66(3): 1175-1182.
- Daims, H., A. Brühl, R. Amann, K. H. Schleifer and M. Wagner (1999). "The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set." *Systematic and Applied Microbiology* 22(3): 434-444.
- Davoli, D., P. Madoni, L. Guglielmi, M. Pergetti and S. Barilli (2002). "Testing the effect of selectors in the control of bulking and foaming in full scale activated-sludge plants." *Water Science and Technology* 46(1-2): 495-498.
- de Liphay, J. R., C. Enzinger, K. Johnsen, J. Aamand and S. J. Sorensen (2004). "Impact of DNA extraction method on bacterial community composition measured by denaturing gradient gel electrophoresis." *Soil Biology & Biochemistry* 36(10): 1607-1614.
- Derjaguin, B. V. and L. Landau (1941). "Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes " *Acta Physicochemistry URSS* 14: 633-662.

- Deronzier, G. and J. M. Choubert (2004). FNDAE n°29 : Traitement du phosphore dans les petites stations d'épuration à boues activées. Comparaisons techniques et économiques des voies de traitement biologique et physico-chimique, CEMAGREF: 49.
- Deronzier, G., S. Schétrite, Y. Racault, J. P. Canler, A. Liénard, A. Héduit and P. Duchène (2002). FNDAE N°25 : Traitement de l'azote dans les stations d'épuration des petites collectivités, CEMAGREF: 79.
- Dionisi, H. M., G. Harms, A. C. Layton, I. R. Gregory, J. Parker, S. A. Hawkins, K. G. Robinson and G. S. Sayler (2003). "Power analysis for real-time PCR quantification of genes in activated sludge and analysis of the variability introduced by DNA extraction." *Applied and Environmental Microbiology* 69(11): 6597-6604.
- Droppo, I. G., D. T. Flannigan, G. G. Leppard, C. Jaskot and S. N. Liss (1996). "Floc stabilization for multiple microscopic techniques." *Applied and Environmental Microbiology* 62(9): 3508-3515.
- Droppo, I. G., G. G. Leppard, D. T. Flannigan and S. N. Liss (1997). "The freshwater floc: A functional relationship of water and organic and inorganic floc constituents affecting suspended sediment properties." *Water Air and Soil Pollution* 99(1-4): 43-53.
- Drzewicki, A. (2009). "Effect of application of polyaluminium chloride on reducing exploitation problems at the wastewater treatment plant in Olsztyn." *Polish Journal of Natural Sciences* 24(3): 158-168.
- Duan, J. M. and J. Gregory (2003). "Coagulation by hydrolysing metal salts." *Advances in Colloid and Interface Science* 100: 475-502.
- Edgar, R. C. (2010). "Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST." *Bioinformatics* 26(19): 2460-2461.
- Eikelboom, D. H. (2000). *Process control of activated sludge plants by microbiologia* CRC PRESS.
- Eikelboom, D. H., A. Andreadakis and K. Andreasen (1998). "Survey of filamentous populations in nutrient removal plants in four European countries." *Water Science and Technology* 37(4-5): 281-289.
- Eikelboom, D. H. and B. Geurkink (2002). "Filamentous micro-organisms observed in industrial activated sludge plants." *Water Science and Technology* 46(1-2): 535-542.
- Erhart, R., D. Bradford, R. J. Seviour, R. Amann and L. L. Blackall (1997). "Development and use of fluorescent in situ hybridization probes for the detection and identification of "Microthrix parvicella" in activated sludge." *Systematic and Applied Microbiology* 20(2): 310-318.
- Eriksson, L., I. Steen and M. Tendaj (1992). "Evaluation of sludge properties at an activated-sludge plant " *Water Science and Technology* 25(6): 251-265.
- Estébanez, V. (2011). *Typologie et activité des populations microbienne nitrifiantes issues des procédés de traitement biologique des effluents agricoles et industriels*. Rennes, Université de Rennes 1: 225.
- FNDAE\_33 (2005). *Dysfonctionnements des stations d'épuration : origines et solutions*.
- Frølund, B., R. Palmgren, K. Keiding and P. H. Nielsen (1996). "Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin." *Water Research* 30(8): 1749-1758.
- Fukushima, T., M. Onuki, H. Satoh and T. Mino (2010). "Effect of pH reduction on polyphosphate- and glycogen-accumulating organisms in enhanced biological phosphorus removal processes." *Water Science and Technology* 62(6): 1432-1439.

- Fukushima, T., N. Uda, M. Onuki, H. Satoh and T. Mino (2007). "Development of the Quantitative PCR Method for Candidatus 'Accumulibacter phosphatis' and Its Application to Activated Sludge." *Journal of Water and Environment Technology* Vol. 5: pp.37-43.
- Gich, F., J. Garcia-Gil and J. Overmann (2001). "Previously unknown and phylogenetically diverse members of the green nonsulfur bacteria are indigenous to freshwater lakes." *Archives of microbiology* 177(1): 1-10.
- Gieseke, A., L. Bjerrum, M. Wagner and R. Amann (2003). "Structure and activity of multiple nitrifying bacterial populations co-existing in a biofilm." *Environmental Microbiology* 5(5): 355-369.
- Gieseke, A., U. Purkhold, M. Wagner, R. Amann and A. Schramm (2001). "Community structure and activity dynamics of nitrifying bacteria in a phosphate-removing biofilm." *Applied and Environmental Microbiology* 67(3): 1351-1362.
- Gillot, S. and J. M. Choubert (2010). "Biodegradable organic matter in domestic wastewaters: comparison of selected fractionation techniques." *Water Science and Technology* 62(3): 630-639.
- Golla, G., C. Hocquet, B. Rakedjian and E. Morin (2010). Bilan 2008 de l'assainissement en France Ministère de l'Écologie, de l'Énergie, du Développement Durable et de la Mer & Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques & Office internationale de l'eau: 28.
- Graveleau, L. (2002). Les dysfonctionnements biologiques dans les stations d'épuration à boue activée : diagnostic de la situation en France sur la période 1999 - 2001. Cemagref Antony.
- Graveleau, L., E. Cotteux and P. Duchene (2005). "Bulking and foaming in France: The 1999-2001 Survey." *Acta Hydrochimica Et Hydrobiologica* 33(3): 223-231.
- Guo, F. and T. Zhang (2013). "Biases during DNA extraction of activated sludge samples revealed by high throughput sequencing." *Applied Microbiology and Biotechnology* 97(10): 4607-4616.
- Haas, B. J., D. Gevers, A. M. Earl, M. Feldgarden, D. V. Ward, G. Giannoukos, D. Ciulla, D. Tabbaa, S. K. Highlander, E. Sodergren, B. Methe, T. Z. DeSantis, J. F. Petrosino, R. Knight, B. W. Birren and C. Human Microbiome (2011). "Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons." *Genome Research* 21(3): 494-504.
- Hamit-Eminovski, J., K. Eskilsson and T. Arnebrant (2010). "Change in surface properties of *Microthrix parvicella* upon addition of polyaluminium chloride as characterized by atomic force microscopy." *Biofouling* 26(3): 323-331.
- Harms, G., A. C. Layton, H. M. Dionisi, I. R. Gregory, V. M. Garrett, S. A. Hawkins, K. G. Robinson and G. S. Sayler (2003). "Real-time PCR quantification of nitrifying bacteria in a municipal wastewater treatment plant." *Environmental Science & Technology* 37(2): 343-351.
- Hauduc, H. (2010). Modèles biocinétiques de boues activées de type ASM : Analyse théorique et fonctionnelle, vers un jeu de paramètres par défaut. Département de Génie Civil et Génie des Eaux et Faculté des Sciences et Génie Paris, Université Laval (Québec) / L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (AgroParisTech - France) 221.p.
- Henze, M., C. P. L. Grady, W. Gujer, G. V. R. Marais and T. Matsuo (1987). "A general model for single-sludge wastewater treatments systems." *Water Research* 21(5): 505-515.



- Henze, M., W. Gujer, T. Mino, T. Matsuo, M. C. Wentzel, G. V. R. Marais and M. C. M. Van Loosdrecht (1999). "Activated Sludge Model No.2d, ASM2d." *Water Science and Technology* 39(1): 165-182.
- Hesselsoe, M., J. L. Nielsen, P. Roslev and P. H. Nielsen (2005). "Isotope labeling and microautoradiography of active heterotrophic bacteria on the basis of assimilation of (CO<sub>2</sub>)-C-14." *Applied and Environmental Microbiology* 71(2): 646-655.
- Higgins, M. J. and J. T. Novak (1997). "Characterization of exocellular protein and its role in bioflocculation." *Journal of Environmental Engineering-Asce* 123(5): 479-485.
- Hou, Y. B., H. Zhang, L. Miranda and S. J. Lin (2010). "Serious Overestimation in Quantitative PCR by Circular (Supercoiled) Plasmid Standard: Microalgal pcna as the Model Gene." *Plos One* 5(3).
- Hug, T., W. Gujer and H. Siegrist (2006). "Modelling seasonal dynamics of "Microthrix parvicella". " *Water Science and Technology* 54(1): 189-198.
- Hugenholtz, P., G. W. Tyson, R. I. Webb, A. M. Wagner and L. L. Blackall (2001). "Investigation of candidate division TM7, a recently recognized major lineage of the domain bacteria with no known pure-culture representatives." *Applied and Environmental Microbiology* 67(1): 411-419.
- Jenkins, D., M. G. Richard and G. T. Daigger (2004). *Manual on the causes and control of activated sludge, bulking, foaming, and other solids separation problems*, CRC Press Taylor & Francis Group
- Jorand, F., F. Boue-Bigne, J. C. Block and V. Urbain (1998). "Hydrophobic/hydrophilic properties of activated sludge exopolymeric substances." *Water Science and Technology* 37(4-5): 307-315.
- Juretschko, S., G. Timmermann, M. Schmid, K. H. Schleifer, A. Pommerening-Roser, H. P. Koops and M. Wagner (1998). "Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: Nitrosococcus mobilis and Nitrospira-like bacteria as dominant populations." *Applied and Environmental Microbiology* 64(8): 3042-3051.
- Kaetzke, A., D. Jentsch and K. Eschrich (2005). "Quantification of Microthrix parvicella in activated sludge bacterial communities by real-time PCR." *Letters in Applied Microbiology* 40(3): 207-211.
- Klindworth, A., E. Pruesse, T. Schweer, J. Peplies, C. Quast, M. Horn and F. O. Glockner (2013). "Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies." *Nucleic Acids Research* 41(1).
- Knaf, T., M. Schade, H. Lemmer and R. Benz (2013). "Specific binding of aluminium and iron ions to a cation-selective cell wall channel of Microthrix parvicella." *Environmental Microbiology* 15(10): 2775-2786.
- Knoop, S. and S. Kunst (1998). "Influence of temperature and sludge loading on activated sludge settling, especially on Microthrix parvicella." *Water Science and Technology* 37(4-5): 27-35.
- Koch, G., M. Kuhni, W. Gujer and H. Siegrist (2000). "Calibration and validation of Activated Sludge Model No. 3 for Swiss municipal wastewater." *Water Research* 34(14): 3580-3590.
- Kong, Y. H., J. L. Nielsen and P. H. Nielsen (2005). "Identity and ecophysiology of uncultured actinobacterial polyphosphate-accumulating organisms in full-scale enhanced biological phosphorus removal plants." *Applied and Environmental Microbiology* 71(7): 4076-4085.



- Kong, Y. H., Y. Xia, J. L. Nielsen and P. H. Nielsen (2007). "Structure and function of the microbial community in a full-scale enhanced biological phosphorus removal plant." *Microbiology-Sgm* 153: 4061-4073.
- Koops, H.-P., U. Purkhold, A. Pommerening-Röser, G. Timmermann and M. Wagner (2003). *The lithotrophic ammonia oxidizing bacteria*. New York, Springer
- Kornberg, A., N. N. Rao and D. Ault-Riche (1999). "Inorganic polyphosphate: A molecule of many functions." *Annual Review of Biochemistry* 68: 89-125.
- Kowalchuk, G. A., Stephen, Jr., W. DeBoer, J. I. Prosser, T. M. Embley and J. W. Woldendorp (1997). "Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class Proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments." *Applied and Environmental Microbiology* 63(4): 1489-1497.
- Kragelund, C., Z. Remesova, J. L. Nielsen, T. R. Thomsen, K. Eales, R. Seviour, J. Wanner and P. H. Nielsen (2007). "Ecophysiology of mycolic acid-containing Actinobacteria (Mycolata) in activated sludge foams." *FEMS Microbiology Ecology* 61(1): 174-184.
- Krhutkova, O., N. Denis and J. Wanner (2005). "Screening of filamentous microorganisms in activated sludge plants." *Acta Hydrochimica Et Hydrobiologica* 33(3): 270-274.
- Krhutkova, O., I. Ruzickova and J. Wanner (2002). "Microbial evaluation of activated sludge and filamentous population at eight Czech nutrient removal activated sludge plants during year 2000." *Water Science and Technology* 46(1-2): 471-478.
- Kumari, S. K. S., Z. Marrengane and F. Bux (2009). "Application of quantitative RT-PCR to determine the distribution of *Microthrix parvicella* in full-scale activated sludge treatment systems." *Applied Microbiology and Biotechnology* 83(6): 1135-1141.
- Lakay, M. T., M. C. Wentzel, G. A. Ekama and G. R. Marais v (1988). "Bulking control with chlorination in a nutrient removal activated sludge system." *Water S.A.* 14(1): 35-42.
- Lebek, M. and K. H. Rosenwinkel (2002). "Control of the growth of *Microthrix parvicella* by using an aerobic selector - results of pilot and full scale plant operation." *Water Science and Technology* 46(1-2): 491-494.
- Li, H. S., Y. Wen, A. S. Cao, J. S. Huang, Q. Zhou and P. Somasundaran (2012). "The influence of additives ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ , and  $\text{Fe}^{3+}$ ) on the interaction energy and loosely bound extracellular polymeric substances (EPS) of activated sludge and their flocculation mechanisms." *Bioresource Technology* 114: 188-194.
- Li, W.-W. and H.-Q. Yu (2014). "Insight into the roles of microbial extracellular polymer substances in metal biosorption." *Bioresource Technology* 160(0): 15-23.
- Li, X. Y. and S. F. Yang (2007). "Influence of loosely bound extracellular polymeric substances (EPS) on the flocculation, sedimentation and dewaterability of activated sludge." *Water Research* 41(5): 1022-1030.
- Liao, B. Q., D. G. Allen, I. G. Droppo, G. G. Leppard and S. N. Liss (2001). "Surface properties of sludge and their role in bioflocculation and settleability." *Water Research* 35(2): 339-350.
- Lv, X. M., M. F. Shao, C. L. Li, J. Li, X. L. Gao and F. Y. Sun (2014). "A Comparative Study of the Bacterial Community in Denitrifying and Traditional Enhanced Biological Phosphorus Removal Processes." *Microbes and Environments* 29(3): 261-268.
- Madoni, P. and D. Davoli (1993). "CONTROL OF MICROTHRIX-PARVICELLA GROWTH IN ACTIVATED-SLUDGE." *Fems Microbiology Ecology* 12(4): 277-284.

- Mallouhi, L. and U. Austermann-Haun (2014). "Occurrence of *Microthrix parvicella* in sequencing batch reactors." *Water Science and Technology* 69(10): 1984-1995.
- Mamais, D., A. Andreadakis, C. Noutsopoulos and C. Kalergis (1998). "Causes of, and control strategies for, *Microthrix parvicella* bulking and foaming in nutrient removal activated sludge systems." *Water Science and Technology* 37(4-5): 9-17.
- Mamais, D., E. Kalaitzi and A. Andreadakis (2011). "Foaming Control in activated sludge treatment plants by coagulants addition " *Global Nest Journal* 13(3): 237-245.
- Manz, W., R. Amann, W. Ludwig, M. Wagner and K. H. Schleifer (1992). "Phylogenetic-oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria." *Systematic and Applied Microbiology* 15(4): 593-600.
- McIlroy, S. J., R. Kristiansen, M. Albertsen, S. M. Karst, S. Rossetti, J. L. Nielsen, V. Tandoi, R. J. Seviour and P. H. Nielsen (2013). "Metabolic model for the filamentous 'Candidatus *Microthrix parvicella*' based on genomic and metagenomic analyses." *ISME Journal* 7(6): 1161-1172.
- Miana, P., L. Grando, G. Caravello and M. Fabris (2002). "*Microthrix parvicella* foaming at the Fusina WWTP." *Water Science and Technology* 46(1-2): 499-502.
- Mielczarek, A. T., C. Kragelund, P. S. Eriksen and P. H. Nielsen (2012). "Population dynamics of filamentous bacteria in Danish wastewater treatment plants with nutrient removal." *Water Research* 46(12): 3781-3795.
- Mielczarek, A. T., A. M. Saunders, P. Larsen, M. Albertsen, M. Stevenson, J. L. Nielsen and P. H. Nielsen (2013). "The Microbial Database for Danish wastewater treatment plants with nutrient removal (MiDas-DK) - a tool for understanding activated sludge population dynamics and community stability." *Water Science and Technology* 67(11): 2519-2526.
- Mikkelsen, L. H. and K. Keiding (2002). "Physico-chemical characteristics of full scale sewage sludges with implications to dewatering." *Water Research* 36(10): 2451-2462.
- Mobarry, B. K., M. Wagner, V. Urbain, B. E. Rittmann and D. A. Stahl (1996). "Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria." *Applied and Environmental Microbiology* 62(6): 2156-2162.
- Morgan-Sagastume, F., J. L. Nielsen and P. H. Nielsen (2008). "Substrate-dependent denitrification of abundant probe-defined denitrifying bacteria in activated sludge." *FEMS Microbiology Ecology* 66(2): 447-461.
- Munz, G., C. Lubello and J. A. Oleszkiewicz (2011). "Factors affecting the growth rates of ammonium and nitrite oxidizing bacteria." *Chemosphere* 83(5): 720-725.
- Muyzer, G., E. C. Dewaal and A. G. Uitterlinden (1993). "Profiling of Complex Microbial-Populations by Denaturing Gradient Gel-Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes-Coding for 16s Ribosomal-Rna." *Applied and Environmental Microbiology* 59(3): 695-700.
- Neyman, K., M. Geneja, B. Quant, M. Dembińska, K. Krucalak, E. Kulbat, I. Kulik-Kuziemska, S. Mikołajski and M. Gielert (2003). "Microbiological and biological aspects of the wastewater treatment plant "Wschód" in Gdańsk." *Polish Journal of Environmental Studies* 12(6): 747-757.
- Nielsen, J. L. and P. H. Nielsen (2002). "Enumeration of acetate-consuming bacteria by microautoradiography under oxygen and nitrate respiring conditions in activated sludge." *Water Research* 36(2): 421-428.

- Nielsen, P. H., H. Daims and H. Lemmer (2009). *FISH Handbook for Biological Wastewater Treatment*, IWA Publishing.
- Nielsen, P. H. and K. Keiding (1998). "Disintegration of activated sludge flocs in presence of sulfide." *Water Research* 32(2): 313-320.
- Nielsen, P. H., C. Kragelund, J. L. Nielsen, S. Tiro, M. Lebek, K. H. Rosenwinkel and A. Gessesse (2005). "Control of *Microthrix parvicella* in activated sludge plants by dosage of polyaluminium salts: Possible mechanisms." *Acta Hydrochimica Et Hydrobiologica* 33(3): 255-261.
- Nielsen, P. H., P. Roslev, T. E. Dueholm and J. L. Nielsen (2002). "*Microthrix parvicella*, a specialized lipid consumer in anaerobic-aerobic activated sludge plants." *Water Science and Technology* 46: 73-80.
- Nielsen, P. H., T. R. Thomsen and J. L. Nielsen (2004). "Bacterial composition of activated sludge - importance for floc and sludge properties." *Water Science and Technology* 49(10): 51-58.
- Noutsopoulos, C., D. Mamais and A. Andreadakis (2010). "Long chain fatty acids removal in selector tanks: Evidence for insufficient *Microthrix parvicella* control." *Desalination and Water Treatment* 23(1-3): 20-25.
- Noutsopoulos, C., D. Mamais and A. Andreadakis (2012). "A hypothesis on *Microthrix parvicella* proliferation in biological nutrient removal activated sludge systems with selector tanks." *Fems Microbiology Ecology* 80(2): 380-389.
- Palmgren, R. and P. H. Nielsen (1996). "Accumulation of DNA in the exopolymeric matrix of activated sludge and bacterial cultures." *Water Science and Technology* 34(5-6): 233-240.
- Paris, S., G. Lind, H. Lemmer and P. A. Wilderer (2005). "Dosing aluminum chloride to control *Microthrix parvicella*." *Acta Hydrochimica Et Hydrobiologica* 33(3): 247-254.
- Parker, D. S., W. J. Kaufman and D. Jenkins (1971). "Physical conditioning of activated sludge floc." *Journal of the Water Pollution Control Federation* 42(9): 1817-1833.
- Pavoni, J. L., M. W. Tenney and W. F. Echelberger, Jr. (1972). "Bacterial exocellular polymers and biological flocculation." *Journal - Water Pollution Control Federation* 44(3): 414-429.
- Pujol, R. and P. Arnaud (2015). "Plaidoyer pour l'optimisation technique et énergétique des stations d'épuration." *Techniques Sciences Méthodes* 32-38(1-2).
- Pujol, R. and P. Boutin (1989). "Control of activated-sludge bulking - From the lab to the plant." *Water Science and Technology* 21(6-7): 717-726.
- Pujol, R. and J. P. Canler (1989). "Le foisonnement des boues activées : Situation du problème en France." *Science, Techniques, Methodes - Eau* 84(n°1): p. 19-24.
- Pujol, R. and J. P. Canler (1994). "Contact zone - French practice with low F/M bulking control." *Water Science and Technology* 29(7): 221-228.
- Pujol, R., P. Duchene, S. Schetrite and J. P. Canler (1991). "Biological foams in activated-sludge plants - characterization and situation." *Water Research* 25(11): 1399-1404.
- Pujol, R., A. Vachon and G. Martin (1990). *FNDAE n°8 : Guide technique sur le foisonnement des boues activées Cemagref*
- Quast, C., E. Pruesse, P. Yilmaz, J. Gerken, T. Schweer, P. Yarza, J. Peplies and F. O. Glockner (2013). "The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools." *Nucleic Acids Research* 41(D1): D590-D596.

- Richard, M. G., Ed. (1989). Activated sludge microbiology. Alexandria, Water Pollution Control Federation.
- Rieger, L., S. Gillot, G. Langergraber, T. Ohtsuki, A. Shaw, I. Takács and S. Winkler (2013). Guidelines for Using Activated Sludge Models, IWA Publishing, London, UK.
- Rieger, L., G. Koch, M. Kuhni, W. Gujer and H. Siegrist (2001). "The EAWAG Bio-P module for activated sludge model No. 3." *Water Research* 35(16): 3887-3903.
- Rochais, E., Krier, J., Héduit, A., Fayoux, C., Gousailles, M. (2010). Optimisation du traitement de l'azote: Le cas des eaux usées de l'agglomération parisienne. Paris, FRANCE, Association générale des hygiénistes et techniciens municipaux.
- Roels, T., F. Dauwe, S. Van Damme, K. De Wilde and F. Roelandt (2002). "The influence of PAX-14 on activated sludge systems and in particular on *Microthrix parvicella*." *Water Science and Technology* 46(1-2): 487-490.
- Rossetti, S., M. C. Tomei, P. H. Nielsen and V. Tandoi (2005). "'microthrix parvicella', a filamentous bacterium causing bulking and foaming in activated sludge systems: A review of current knowledge." *FEMS Microbiology Reviews* 29(1): 49-64.
- Rossetti, S., M. C. Tomel, C. Levantesi, R. Ramadori and V. Tandoi (2002). "'Microthrix parvicella': a new approach for kinetic and physiological characterization." *Water Science and Technology* 46(1-2): 65-72.
- Rotthauwe, J. H., K. P. Witzel and W. Liesack (1997). "The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: Molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations." *Applied and Environmental Microbiology* 63(12): 4704-4712.
- Rouvière, L. (2008). Enquête et sondage.
- Sakka, K. and H. Takahashi (1982). "DNA-binding activity of cells of deoxyribonuclease-susceptible floc forming *Pseudomonas* SP. ." *Agricultural and Biological Chemistry* 46(7): 1775-1781.
- Schloss, P. D., S. L. Westcott, T. Ryabin, J. R. Hall, M. Hartmann, E. B. Hollister, R. A. Lesniewski, B. B. Oakley, D. H. Parks, C. J. Robinson, J. W. Sahl, B. Stres, G. G. Thallinger, D. J. Van Horn and C. F. Weber (2009). "Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities." *Applied and Environmental Microbiology* 75(23): 7537-7541.
- Seviour, R. and P. H. Nielsen (2010). *Microbial Ecology of Activated Sludge*, IWA.
- Seviour, R. J. and S. McIlroy (2008). "The microbiology of phosphorus removal in activated sludge processes - the current state of play." *Journal of Microbiology* 46(2): 115-124.
- Shannon, C. (1948). "A mathematical theory of communication." *The Bell System Technical Journal* 27:379-423 and 623-656.
- Simpson, E. (1949). "Measurement of diversity." *Nature* 163:688.
- Slijkhuis, H., J. W. Vangroenestijn and D. J. Kijlstra (1984). "*Microthrix parvicella*, a filamentous bacterium from activated sludge - growth on Tween 80 as carbon and energy source." *Journal of General Microbiology* 130(AUG): 2035-2042.
- Smith, C. J., D. B. Nedwell, L. F. Dong and A. M. Osborn (2006). "Evaluation of quantitative polymerase chain reaction-based approaches for determining gene copy and gene transcript numbers in environmental samples." *Environmental Microbiology* 8(5): 804-815.

- Smith, S., I. Takacs, S. Murthy, G. T. Daigger and A. Szabo (2008). "Phosphate complexation model and its implications for chemical phosphorus removal." *Water Environment Research* 80(5): 428-438.
- Stricker, A. E. and A. Heduit (2010). *Phosphore des eaux usées : état des lieux et perspectives, Rapport pour l'ONEMA*.
- Struijs, J., Stoltenkamp, J. and Van De Meent, D. (1991). "A spreadsheet-based box model to predict the fate of xenobiotics in a municipal wastewater treatment plant". *Water Research* 27(7): 891-900.
- Szabo, A., I. Takacs, S. Murthy, G. T. Daigger, I. Licsko and S. Smith (2008). "Significance of design and operational variables in chemical phosphorus removal." *Water Environment Research* 80(5): 407-416.
- Tandoi, V., D. Jenkins and J. Wanner (2006). *Activated sludge separation problems*, IWA.
- Tandoi, V., S. Rossetti, L. L. Blackall and M. Majone (1998). "Some physiological properties of an Italian isolate of *Microthrix parvicella*." *Water Science and Technology* 37(4-5): 1-8.
- Thomsen, T. R., B. V. Kjellerup, J. L. Nielsen, P. Hugenholtz and P. H. Nielsen (2002). "In situ studies of the phylogeny and physiology of filamentous bacteria with attached growth." *Environmental Microbiology* 4(7): 383-391.
- Verwey, E. J. W. and J. G. Overbeek (1948). *Theory of the stability of lyophobic colloids*. Amsterdam.
- Vishnivetskaya, T. A., A. C. Layton, M. C. Y. Lau, A. Chauhan, K. R. R. Cheng, A. J. Meyers, J. R. Murphy, A. W. Rogers, G. S. Saarunya, D. E. Williams, S. M. Pfiffner, J. P. Biggerstaff, B. T. Stackhouse, T. J. Phelps, L. Whyte, G. S. Sayler and T. C. Onstott (2014). "Commercial DNA extraction kits impact observed microbial community composition in permafrost samples." *FEMS Microbiology Ecology* 87(1): 217-230.
- Wagner, M., R. Amann, H. Lemmer, W. Manz and K. H. Schleifer (1994). "Probing activated-sludge with fluorescently labeled ribosomal RNA targeted oligonucleotides." *Water Science and Technology* 29(7): 15-23.
- Wakefield, R. W. and J. A. Slim (1988). "The practical application of various techniques to control sludge bulking." *Journal of the Institution of Water and Environmental Management* 2(3): 311-318.
- Wang, Q., G. M. Garrity, J. M. Tiedje and J. R. Cole (2007). "Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy." *Applied and Environmental Microbiology* 73(16): 5261-5267.
- Wang, X. H., M. Hu, Y. Xia, X. H. Wen and K. Ding (2012). "Pyrosequencing Analysis of Bacterial Diversity in 14 Wastewater Treatment Systems in China." *Applied and Environmental Microbiology* 78(19): 7042-7047.
- Wanner, J. (1994). *Activated Sludge Bulking and Foaming Control* Technomic Publishing Company
- Wilen, B. M., B. Jin and P. Lant (2003). "The influence of key chemical constituents in activated sludge on surface and flocculating properties." *Water Research* 37(9): 2127-2139.
- Xie, B., X. C. Dai and Y. T. Xu (2007). "Cause and pre-alarm control of bulking and foaming by *Microthrix parvicella* - A case study in triple oxidation ditch at a wastewater treatment plant." *Journal of Hazardous Materials* 143(1-2): 184-191.

- Yang, S. F. and X. Y. Li (2009). "Influences of extracellular polymeric substances (EPS) on the characteristics of activated sludge under non-steady-state conditions." *Process Biochemistry* 44(1): 91-96.
- Zhang, X. V., H. Zhou, M. Theodoulou and S. N. Liss (2010). Quantification of *Microthrix parvicella* and *Gordonia* species using Quantitative Real-time PCR (qPCR) in submerged Membrane Bioreactor for Municipal Wastewater Treatment. WEFTEC Water Environment Federation.
- Zilles, J. L., C. H. Hung and D. R. Noguera (2002). "Presence of Rhodocyclus in a full-scale wastewater treatment plant and their participation in enhanced biological phosphorus removal." *Water Science and Technology* 46(1-2): 123-128.
- Zilles, J. L., J. Peccia, M. W. Kim, C. H. Hung and D. R. Noguera (2002). "Involvement of Rhodocyclus-related organisms in phosphorus removal in full-scale wastewater treatment plants." *Applied and Environmental Microbiology* 68(6): 2763-2769.
- Zita, A. and M. Hermansson (1994). "Effect of ionic-strength on bacterial adhesion and stability of flocs in a waste-water activated-sludge system." *Applied and Environmental Microbiology* 60(9): 3041-3048.
- Zita, A. and M. Hermansson (1997). "Effects of bacterial cell surface structures and hydrophobicity on attachment to activated sludge flocs." *Applied and Environmental Microbiology* 63(3): 1168-1170.

## **Annexes**

---





## Sommaire des annexes

<b><u>ANNEXE 1 : QUESTIONNAIRE DE L'ENQUÊTE NATIONALE SUR LES DYSFONCTIONNEMENTS BIOLOGIQUES SURVENANT SUR LES STATIONS D'ÉPURATION À BOUES ACTIVÉES .....</u></b>	<b><u>173</u></b>
<b><u>ANNEXE 2 : MODÉLISATION DYNAMIQUE DU FONCTIONNEMENT DU PILOTE .....</u></b>	<b><u>177</u></b>
<b><u>ANNEXE 3 : PROTOCOLE D'HYBRIDATION <i>IN SITU</i> DE SONDE FLUORESCENTES (FISH) .....</u></b>	<b><u>182</u></b>
<b><u>ANNEXE 4 : PRINCIPE DE LA MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE À BALAYAGE (MEB) .....</u></b>	<b><u>185</u></b>
<b><u>ANNEXE 5 : PRINCIPE DE LA PCR ET DE LA QPCR .....</u></b>	<b><u>187</u></b>
<b><u>ANNEXE 6 : PRINCIPE DE LA DGGE.....</u></b>	<b><u>190</u></b>
<b><u>ANNEXE 7 : PRINCIPE SIMPLIFIÉ DU SÉQUENÇAGE HAUT DÉBIT SELON LA TECHNOLOGIE D'ILLUMINA MISEQ.....</u></b>	<b><u>192</u></b>
<b><u>ANNEXE 8 : CALCUL DE LA MARGE D'ERREUR .....</u></b>	<b><u>193</u></b>
<b><u>ANNEXE 9 : CARACTÉRISATION DU FONCTIONNEMENT DU PILOTE PILBIO .....</u></b>	<b><u>195</u></b>
<b><u>ANNEXE 10 : FRACTIONNEMENT DE LA DCO SOUS SIMBA.....</u></b>	<b><u>197</u></b>
<b><u>ANNEXE 11 : ÉVOLUTION DE LA TEMPÉRATURE ET DE L'INDICE DE BOUES AU COURS DU TEMPS - SUIVI ALCL<sub>3</sub> ET AL-FE-CL<sub>3</sub>.....</u></b>	<b><u>198</u></b>
<b><u>ANNEXE 12 : CARACTÉRISATION DES BACTÉRIES FILAMENTEUSE PAR OBSERVATIONS MICROSCOPIQUE ET COLORATION GRAM ET NEISSER .....</u></b>	<b><u>199</u></b>
<b><u>ANNEXE 13 : ÉVOLUTION DES MOUSSES BIOLOGIQUES AU COURS DE L'ESSAI 2 DU SUIVI ALCL<sub>3</sub> ....</u></b>	<b><u>200</u></b>
<b><u>ANNEXE 14 : OBSERVATIONS FISH – SUIVI AL-FE-CL<sub>3</sub>.....</u></b>	<b><u>201</u></b>
<b><u>ANNEXE 15 : BIODIVERSITÉ DES BOUES ACTIVÉES.....</u></b>	<b><u>202</u></b>

## Annexe 1 : Questionnaire de l'enquête nationale sur les dysfonctionnements biologiques survenant sur les stations d'épuration à boues activées

### Enquête nationale sur les dysfonctionnements biologiques survenant sur les stations d'épuration à boues activées

Une étude du Cemagref portant sur l'occurrence des dysfonctionnements biologiques en France a été menée entre 1999 et 2001 à l'initiative de la Direction de l'Eau du Ministère de l'Environnement et du Développement Durable. Il y était indiqué que 30% des stations d'épuration à boues activées en France présentaient de manière continue ou occasionnelle des dysfonctionnements biologiques (foisonnement et moussage).

Irstea (anciennement Cemagref) réalise une nouvelle enquête afin de réactualiser ces données et d'identifier les différentes solutions mises en place pour solutionner ces problèmes.

Ce projet ne peut avoir lieu sans votre participation et votre expertise, nous vous remercions donc par avance du temps que vous pourrez nous accorder. Nous vous précisons que la sélection de votre station s'est faite par tirage aléatoire à partir d'une base de données gouvernementale. Les informations que vous nous communiquerez seront gardées confidentielles par Irstea.

Vous pouvez également remplir ce sondage sur internet via le lien : <http://sondage.irstea.fr/> puis en sélectionnant :  
« Enquête nationale sur les dysfonctionnements biologiques survenant sur les stations d'épuration à boues activées ».  
Questionnaire à nous retourner de préférence avant le 30 mars 2014.

#### 1. Coordonnées

Afin de vous communiquer les résultats de l'enquête, nous avons besoin de vos coordonnées :

Votre nom et prénom : \_\_\_\_\_

Téléphone : \_\_\_\_\_ Mail : \_\_\_\_\_

Société ou organisme chargé de l'exploitation : \_\_\_\_\_

Si connu, code STEU : \_\_\_\_\_



#### 2. Typologie de la station

**Merci de compléter et cocher vos réponses dans les cases correspondantes.**

2.1 Réalisez-vous un traitement de l'azote :

☐ Nitrification ☐ Nitrification/Dénitrification ☐ Aucun traitement

2.2 Réalisez-vous un traitement du phosphore (Une seule réponse est souhaitée) :

<input type="checkbox"/> Aucun traitement	<input type="checkbox"/> Traitement physico-chimique seul	<input type="checkbox"/> Déphosphatation biologique seule
<input type="checkbox"/> Déphosphatation biologique et traitement physico chimique complémentaire		

Si vous utilisez un traitement physico-chimique, pouvez-vous nous indiquer les informations suivantes sur le produit utilisé :

Le composé chimique : \_\_\_\_\_ et/ou le nom commercial : \_\_\_\_\_

Si connu,  
Le volume (en litre) journalier injecté : \_\_\_\_\_ la concentration en produit actif (en %) : \_\_\_\_\_

2.3 Avez-vous des rejets industriels : ☐ Oui ☐ Non

Si oui, quels sont les rejets dominants (tout rejet supérieur à 10% de la charge, exemple : industrie Agro-alimentaire, chimique, etc.) :

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_





### 3. Identification des dysfonctionnements biologiques

#### 3.1. Dysfonctionnement biologique de type foisonnement des boues (\*):

3.1.1 Avez-vous été confronté à un foisonnement des boues au cours des 12 derniers mois ?

- ☐ **Oui, de façon permanente** (*indice de boues > 200 mL.g<sup>-1</sup> toute l'année*)  
Si oui, avez-vous constaté un développement de bactéries filamenteuses lors de ces événements ? ☐ Oui ☐ Non ☐ Ne sais pas
- ☐ **Oui, de façon récurrente** (*indice de boues > 200 mL.g<sup>-1</sup> durant 3 à 6 mois*)  
Si oui, avez-vous constaté un développement de bactéries filamenteuses lors de ces événements ? ☐ Oui ☐ Non ☐ Ne sais pas
- ☐ **Oui, ponctuellement** (*indice de boues > 200 mL.g<sup>-1</sup> durant 2 à 3 semaines, parfois plusieurs fois par an*)  
Si oui, avez-vous constaté un développement de bactéries filamenteuses lors de ces événements ? ☐ Oui ☐ Non ☐ Ne sais pas
- ☐ **Non**

Si oui, à votre connaissance quel(s) type(s) de filament était présent lors de ces épisodes de foisonnement ?

-----

Dans le cas où vous êtes confronté à un foisonnement récurrent :

Avez-vous été confronté à des dysfonctionnements du même ordre les années précédentes ?

-----

A quelle(s) période(s) surviennent-ils le plus souvent ?

-----



(\*) Un indice de boues supérieur à 200 mL/g sur plusieurs semaines est souvent associé à un dysfonctionnement biologique de type foisonnement des boues. Pour plus d'informations vous pouvez consulter le FNDAE n°33 ou nous contacter.

3.1.2 Dans le cas où des dysfonctionnements biologiques du type foisonnement sont survenus, savez-vous comment ont-ils été résolus ?

☐ Oui ☐ Non

Si oui :

3.1.2.a Un traitement curatif a été mis en place : ☐ Oui ☐ Non

Si oui, à votre connaissance de quel type de traitement s'agissait-il ?  
Plusieurs réponses possibles

☐ Chloration ☐ Sels d'aluminium ☐ Sels de fer ☐ Lestant (ex : cendre) ☐ Polymère ☐ Autre : \_\_\_\_\_

Si vous avez des informations complémentaires que vous souhaitez nous communiquer (fournisseur, doses appliquées, condition d'injection, etc.) :

-----  
-----  
-----

3.1.2.b Certains réglages de la station ont-ils été modifiés : ☐ Oui ☐ Non

Si oui, quel(s) type(s) de paramètre (ex : Aération, Recirculation, etc.) ?

-----  
-----  
-----

3.1.3 Autres informations que vous souhaitez porter à notre connaissance :

-----  
-----  
-----

### 3.2. Dysfonctionnement biologique de type moussage (\*) :

Avez-vous été confronté à un phénomène de moussage au cours des 12 derniers mois ?



☐ **Oui, de façon permanente** (mousses plus ou moins denses présentes toute l'année)

Si oui, avez-vous constaté un développement de bactéries filamenteuses lors de ces événements ? ☐ Oui ☐ Non ☐ Ne sais pas

☐ **Oui, de façon récurrente** (durant 3 à 6 mois sur la même période chaque année)

Si oui, avez-vous constaté un développement de bactéries filamenteuses lors de ces événements ? ☐ Oui ☐ Non ☐ Ne sais pas

☐ **Oui, ponctuellement** (quelques fois et parfois plusieurs fois par an)

Si oui, avez-vous constaté un développement de bactéries filamenteuses lors de ces événements ? ☐ Oui ☐ Non ☐ Ne sais pas

☐ **Non**

Si oui, à votre connaissance quel(s) type(s) de filament était présent lors de ces épisodes de moussage ?

Dans le cas où vous êtes confronté à un phénomène de moussage récurrent :

Avez-vous été confronté à des dysfonctionnements du même ordre les années précédentes ?

A quelle(s) période(s) surviennent-ils le plus souvent ?



(\*) Le moussage est un dysfonctionnement biologique qui se caractérise par l'apparition d'une couche de mousse de boues dense, d'une épaisseur supérieure à 10 cm à la surface des bassins.

Pour plus d'informations vous pouvez consulter le FNDAE n°33 ou nous contacter.

3.2.2 Dans le cas où des dysfonctionnements biologiques du type moussage sont survenus, savez-vous comment ont ils été résolus ?

☐ Oui ☐ Non

Si oui :

3.2.2.a Un traitement curatif a été mis en place : ☐ Oui ☐ Non

Si oui, à votre connaissance de quel type de traitement s'agissait-il ?

Plusieurs réponses possibles

☐ Chloration ☐ Sels d'aluminium ☐ Sels de fer ☐ Lestant (ex : cendre) ☐ Polymère ☐ Autre : \_\_\_\_\_

Si vous avez des informations complémentaires que vous souhaitez nous communiquer (fournisseur, doses appliquées, condition d'injection, etc.) :

-----  
-----  
-----  
-----

3.2.2.b Certains réglages de la station ont-ils été modifiés : ☐ Oui ☐ Non

Si oui, quel(s) type(s) de paramètre (ex : Aération, Recirculation, etc.) ?

-----  
-----  
-----

3.2.3 Autres informations que vous souhaitez porter à notre connaissance :

-----  
-----  
-----  
-----

#### 4. Informations complémentaires

##### 4.1 Mesure de l'indice de boue :

- Réalisez-vous des tests de décantation :

<input type="checkbox"/> l'Indice de boues	<input type="checkbox"/> l'Indice de Mohlman	<input type="checkbox"/> Vitesse de décantation en 30 min	<input type="checkbox"/> Non
--------------------------------------------	----------------------------------------------	-----------------------------------------------------------	------------------------------

- Pouvez-vous nous communiquer sous format Excel (ou similaire) le suivi sur les trois dernières années, des concentrations en MES, MVS, du suivi de l'indice de boues (ou de Mohlman) et de la température des bassins si mesurée. Ces informations nous seront nécessaires pour la suite de l'enquête.

<input type="checkbox"/> Envois par mail : <a href="mailto:dysbio@irstea.fr">dysbio@irstea.fr</a>	<input type="checkbox"/> Envois par courrier sur un support informatique à l'adresse : Centre d'Antony - 1 rue Pierre-Gilles de Gennes - CS 10030 92761 Antony Cedex	<input type="checkbox"/> Non
------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------

##### 4.2 A votre connaissance, en ce qui concerne la station d'épuration actuellement (Moyenne annuelle 2012) :

Charge hydraulique ( $\text{m}^3 \cdot \text{j}^{-1}$ ) : \_\_\_\_\_ Charge massique ( $\text{kg DBO}_5 \cdot (\text{kg MVS})^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ ) : \_\_\_\_\_  
 Charge organique ( $\text{DBO}_5 \text{ entrante} \cdot \text{j}^{-1}$ ) : \_\_\_\_\_ Age de boue moyen (j) : \_\_\_\_\_

##### 4.3 Bilan :

Informations complémentaires que vous souhaitez porter à notre connaissance (notamment des indications sur d'autres constats que vous auriez observés) :

-----  
 -----  
 -----

Nous vous remercions du temps que vous nous avez accordé.

Nous vous communiquerons les résultats de l'enquête.

Pour toutes informations supplémentaires, vous pouvez-nous contacter au 01 40 96 61 01 ou sur [dysbio@irstea.fr](mailto:dysbio@irstea.fr)



## Annexe 2 : Modélisation dynamique du fonctionnement du pilote

Les définitions et les valeurs des paramètres des processus hétérotrophiques, de déphosphatation biologique et autotrophiques sont respectivement décrits dans le Tableau A. 1, le Tableau A. 2 et le Tableau A. 3. Les valeurs de fractionnement sont décrites dans le Tableau A. 4. La définition et les valeurs des paramètres pour l'aération et la précipitation physico-chimique du phosphore sont décrits dans le Tableau A. 5. La matrice de Gujer est donnée dans le Tableau A. 6.

**Tableau A. 1 : Définitions et valeurs des paramètres des processus hétérotrophes A 20°C avec le facteur de correction de la température entre parenthèses**

Paramètre	Définition	Valeur	Unité	Référence
YH_aer	Taux de conversion aérobie	0,7	g DCO (g DCO) <sup>-1</sup>	(Choubert <i>et al.</i> 2009)
YH_anox	Taux de conversion en anoxie	0,65	g DCO (g DCO) <sup>-1</sup>	(Choubert <i>et al.</i> 2009)
YSTO_aer	Taux de conversion aérobie de XSTO	0,8375	g DCO (g DCO) <sup>-1</sup>	Calibration SIMBA
YSTO_anox	Taux de conversion de XSTO en anoxie	0,803	g DCO (g DCO) <sup>-1</sup>	Calibration SIMBA
fxI	Fraction d'inerte générée lors de la lyse de la biomasse	0,2	g DCO (g DCO) <sup>-1</sup>	(Koch <i>et al.</i> 2000)
Kh_20	Constante d'hydrolyse à 20°C	9 (0,04)	j <sup>-1</sup>	(Rieger <i>et al.</i> 2001)
KX	Coefficient de saturation/inhibition pour la DCO particulaire	1	g XS (g XH) <sup>-1</sup>	(Koch <i>et al.</i> 2000)
k_sto_20	Taux de stockage maximum à 20°C	12 (0,07)	j <sup>-1</sup>	(Rieger <i>et al.</i> 2001)
muH_20	Taux de croissance maximum à 20°C	3 (0,07)	g XS (g XH) <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup>	(Rieger <i>et al.</i> 2001)
etaHNO3	Facteur de réduction de la croissance et du stockage en anoxie	0,8		(Rieger <i>et al.</i> 2001)
bH_20	Coefficient de respiration endogène de la biomasse	0,33 (0,07)	j <sup>-1</sup>	(Rieger <i>et al.</i> 2001)
bSTO_20	Coefficient de respiration endogène sur XSTO	0,3 (0,07)	j <sup>-1</sup>	(Rieger <i>et al.</i> 2001)
etaHend	Facteur de réduction de la lyse anoxique	0,33		(Rieger <i>et al.</i> 2001)
KHO2	Constante d'affinité pour l'oxygène	0,2	g O2 m <sup>3</sup>	(Rieger <i>et al.</i> 2001)
KHSS	Constante d'affinité pour le substrat SS	10	g DCO m <sup>3</sup>	(Rieger <i>et al.</i> 2001)
KHNO3	Constante d'affinité pour les nitrates	0,5	g N m <sup>3</sup>	(Rieger <i>et al.</i> 2001)
KHNH4	Constante d'affinité pour l'ammonium	0,01	g N m <sup>3</sup>	(Koch <i>et al.</i> 2000)
KHPO4	Constante d'affinité pour SPO4	0,011	g P m <sup>3</sup>	(Rieger <i>et al.</i> 2001)
KHALK	Constante d'affinité pour l'alcalinité (HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	0,1	mole HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> m <sup>3</sup>	(Koch <i>et al.</i> 2000)
KHSTO	Constante de saturation pour les produits de stockage (XSTO)	0,1	g DCO m <sup>3</sup>	(Rieger <i>et al.</i> 2001)

**Tableau A. 2 : Définitions et valeurs des paramètres des processus associés à la déphosphatation biologique A 20°C avec le facteur de correction de la température entre parenthèses**

Paramètre	Définition	Valeur	Unité	Référence
qPHA_20	Coefficient de stockage du XPHA	6 (0,04)	j <sup>-1</sup>	(Rieger <i>et al.</i> 2001)
qPP_20	Coefficient de stockage de XPP	1,5 (0,04)	j <sup>-1</sup>	(Rieger <i>et al.</i> 2001)
muPAO_20	Taux de croissance des PAO à 20°C	1,0 (0,07)	j <sup>-1</sup>	(Rieger <i>et al.</i> 2001)
etaNO_PAO	Facteur de réduction de la croissance des PAO en anoxie	0,6		(Rieger <i>et al.</i> 2001)
bPAO_20	Coefficient de respiration endogène	0,2 (0,07)	j <sup>-1</sup>	(Rieger <i>et al.</i> 2001)
etaNOend_PAO	Facteur de réduction de la respiration endogène en anoxie	0,33		(Rieger <i>et al.</i> 2001)
bPP_20	Coefficient de la lyse de XPP	0,2 (0,07)	j <sup>-1</sup>	(Rieger <i>et al.</i> 2001)
etaNOLys_PP	Facteur de réduction de la lyse de XPP en anoxie	0,33		(Rieger <i>et al.</i> 2001)
bPHA_20	Coefficient de la respiration endogène de XPHA	0,2	j <sup>-1</sup>	(Rieger <i>et al.</i> 2001)
etaNOresp_PHA	Facteur de réduction de la lyse de XPHA en anoxie	0,33		(Rieger <i>et al.</i> 2001)
KSS_PAO	Constante d'affinité pour le substrat SS	10	g DCO m <sup>3</sup>	(Rieger <i>et al.</i> 2001)
KALK_PAO	Constante d'affinité pour l'alcalinité (HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	0,1	mole HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> m <sup>3</sup>	(Rieger <i>et al.</i> 2001)
KPP_PAO	Ratio maximal XPP/XPAO	0,05	g P (g DCO) <sup>-1</sup>	(Rieger <i>et al.</i> 2001)
KO_PAO	Constante d'affinité pour l'oxygène	0,2	g O <sub>2</sub> m <sup>3</sup>	(Rieger <i>et al.</i> 2001)
KPHA	Constante de saturation pour XPHA/XPAO	0,1	g COD (g DCO) <sup>-1</sup>	(Rieger <i>et al.</i> 2001)
Kmax_PAO	Constante de saturation de XPP/XPAO	0,2	g P (g DCO) <sup>-1</sup>	(Rieger <i>et al.</i> 2001)
KiPP_PAO	Constante d'inhibition de XOO/XPAO	0,05	g P (g DCO) <sup>-1</sup>	(Rieger <i>et al.</i> 2001)
KNO_PAO	Constante d'affinité pour les nitrates	0,5	g N m <sup>3</sup>	(Rieger <i>et al.</i> 2001)
KPO4_PP	Constante d'affinité pour SPO4 pour le stockage de XPP	0,2	g P m <sup>3</sup>	(Rieger <i>et al.</i> 2001)
KPO4_PAO	Constante d'affinité pour SPO4 pour la croissance des PAO	0,01	g P m <sup>3</sup>	(Rieger <i>et al.</i> 2001)
KNH_PAO	Constante d'affinité pour l'ammonium	0,05	g N m <sup>3</sup>	(Rieger <i>et al.</i> 2001)
YPAO_O2	Taux de conversion aérobie de XPHA par la biomasse	0,6	g DCO (g DCO) <sup>-1</sup>	(Rieger <i>et al.</i> 2001)
YPAO_NO	Taux de conversion en anoxie de XPHA par la biomasse	0,5	g DCO (g DCO) <sup>-1</sup>	(Rieger <i>et al.</i> 2001)
YPHA	Taux de conversion de XPHA par XPP stocké (Stockage de P)	0,2	g COD (g P) <sup>-1</sup>	(Rieger <i>et al.</i> 2001)
YPO4	Taux de conversion de XPP par XPHA stocké (Relargage de P)	0,35	g P (g DCO) <sup>-1</sup>	(Rieger <i>et al.</i> 2001)



**Tableau A. 3 : Définitions et valeurs des paramètres des processus autotrophes  
A 20°C avec le facteur de correction de la température entre parenthèses**

Paramètre	Définition	Valeur	Unité	Référence
YA	Taux de conversion	0,24	g DCO (g DCO) <sup>-1</sup>	(Koch <i>et al.</i> 2000)
muAUT_20	Taux de croissance maximum à 20°C	1 (0,105)	j <sup>-1</sup>	(Koch <i>et al.</i> 2000)
bAUT_20	Coefficient de respiration endogène	0,18 (0,105)	j <sup>-1</sup>	(Rieger <i>et al.</i> 2001)
etaNend	Facteur de réduction de la lyse en anoxie	0,5		(Rieger <i>et al.</i> 2001)
KNO2	Constante d'affinité pour l'oxygène	0,5	g O2 m <sup>3</sup>	(Koch <i>et al.</i> 2000)
KNNH4	Constante d'affinité pour l'ammonium	0,7	g N m <sup>3</sup>	Calibration SIMBA
KNPO4	Constante d'affinité pour SPO4	0,01	g P m <sup>3</sup>	(Rieger <i>et al.</i> 2001)
KNALK	Constante d'affinité pour l'alcalinité (HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	0,5	mole HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> m <sup>3</sup>	(Koch <i>et al.</i> 2000)

**Tableau A. 4 : Définitions et valeurs des paramètres de fractionnement**

Paramètre	Définition	Valeur	Unité	Référence
iNSI	Fraction en N dans les inertes solubles DCO	0,01	g N (g DCO) <sup>-1</sup>	(Koch <i>et al.</i> 2000)
iNSS	Fraction en N dans la matière rapidement biodégradable (SS)	0,03	g N (g DCO) <sup>-1</sup>	(Koch <i>et al.</i> 2000)
iNXI	Fraction en N dans les inertes particulières DCO XI	0,04	g N (g DCO) <sup>-1</sup>	(Rieger <i>et al.</i> 2001)
iNXS	Fraction en N dans la matière lentement biodégradable XS	0,03	g N (g DCO) <sup>-1</sup>	(Rieger <i>et al.</i> 2001)
iNBM	Fraction en N dans la biomasse	0,08	g N (g DCO) <sup>-1</sup>	Calibration SIMBA
iTSSXI	Ratio MES/ DCO pour XI	0,75	g TSS (g DCO) <sup>-1</sup>	(Rieger <i>et al.</i> 2001)
iTSSXS	Ratio MES/DCO pour XS	0,75	g TSS (g COD) <sup>-1</sup>	(Rieger <i>et al.</i> 2001)
iTSSSTO	Ratio MES/DCO pour XSTO et XPHA	0,6	g TSS (g COD) <sup>-1</sup>	(Rieger <i>et al.</i> 2001)
iTSSBM	Ratio MES/DCO pour la biomasse (XA, XH, XPAO)	0,9	g TSS (g DCO) <sup>-1</sup>	(Rieger <i>et al.</i> 2001)
iTSSXPP	Ratio MES/DCO pour XPP	3,23	g TSS (g XPP) <sup>-1</sup>	(Rieger <i>et al.</i> 2001)
fSI	Production de SI lors de l'hydrolyse	0	g COD (g DCO) <sup>-1</sup>	(Rieger <i>et al.</i> 2001)
iPSS	Fraction de P dans la matière facilement biodégradable (SS)	0	gP (g DCO) <sup>-1</sup>	(Rieger <i>et al.</i> 2001)
iPSI	Fraction de P dans les inertes solubles (SI)	0	gP (g DCO) <sup>-1</sup>	(Rieger <i>et al.</i> 2001)
iPXI	Fraction de P dans les inertes particulières (XI)	0,02	gP (g DCO) <sup>-1</sup>	Calibration
iPXS	Fraction de P dans la matière lentement biodégradable (XS)	0,01	gP (g DCO) <sup>-1</sup>	Calibration
iPBM	Fraction de P dans la biomasse	0,02	gP (g DCO) <sup>-1</sup>	Calibration



Tableau A. 5 : Définitions et valeurs des paramètres pour l'aération et la précipitation physico-chimique

Paramètre	Définition	Valeur	Unité	Référence
<b>Précipitation physico-chimique du phosphore</b>				
kPRE	Constante de précipitation de P	1	$\text{m}^3 (\text{g Fe(OH)}_3 \text{ j})^{-1}$	(Henze <i>et al.</i> 1999)
kRED	Constante de redissolution	0,6	$\text{j}^{-1}$	(Henze <i>et al.</i> 1999)
KALK_PRE	Constante d'affinité pour l'alcalinité ( $\text{HCO}_3^-$ )	0,5	$\text{mole HCO}_3^- \text{ m}^3$	(Henze <i>et al.</i> 1999)
KFe	Constante d'affinité de Me pour $\text{SPO}_4$	0,5		Calibration SIMBA
nu	Efficacité de précipitation	0,7		Calibration SIMBA
<b>Aération</b>				
SOsat_20		8,63736	$\text{g DO m}^3$	

Tableau A. 6 : Matrice stœchiométrique et cinétique des processus biologiques

	SO	SS	SNH	SNO	SN2	SPO4	SALK	SI	XI	XS	XH	XSTO	XA	XPAO	XPP	XPHA	XMEOH	XMEP	XMI	Rate
p1	0	$1 - f_{SI}$	$c_{1n}$	0	0	$c_{1p}$	$c_{1a}$	$f_{SI}$	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	$k_h \frac{XS}{XH} \frac{1}{KX + \frac{XS}{XH}} XH$
p2	$Y_{STO_{ser}} - 1$	-1	$c_{2n}$	0	0	$iPSS$	$c_{2a}$	0	0	0	0	$Y_{STO_{ser}}$	0	0	0	0	0	0	0	$k_{sto} \frac{SO}{KHO2 + SO} \frac{SS}{KHSS + SS} XH$
p3	0	-1	$c_{3n}$	$c_{3no}$	-1 $c_{3no}$	$iPSS$	$c_{3a}$	0	0	0	0	$Y_{STO_{nox}}$	0	0	0	0	0	0	0	$k_{sto} \frac{KHO2}{KHO2 + SO} \frac{SS}{KHSS + SS} \frac{SNO}{KHNO3 + SNO} XH$
p4	$1 - \frac{1}{Y_{H_{ser}}}$	0	$c_{4n}$	0	0	0 - $iPBM$	$c_{4a}$	0	0	0	1	$\frac{-1}{Y_{H_{ser}}}$	0	0	0	0	0	0	0	$\mu_{uH} \frac{SO}{KHO2 + SO} \frac{SNH}{KHNH4 + SNH} \frac{SPO4}{KHP04 + SPO4} \frac{SALK}{KHALK + SALK} \frac{XSTO}{XH} \frac{1}{KHSTO + \frac{XSTO}{XH}} XH$
p5	0	0	$c_{5n}$	$c_{5no}$	-1 $c_{5no}$	0 - $iPBM$	$c_{5a}$	0	0	0	1	$\frac{-1}{Y_{H_{nox}}}$	0	0	0	0	0	0	0	$\mu_{uH} \frac{KHO2}{KHO2 + SO} \frac{SNH}{KHNH4 + SNH} \frac{SPO4}{KHP04 + SPO4} \frac{SALK}{KHALK + SALK} \frac{XSTO}{XH} \frac{1}{KHSTO + \frac{XSTO}{XH}} XH$
p6	-1 (1 - $f_{XI}$ )	0	$c_{6n}$	0	0	$c_{6p}$	$c_{6a}$	0	$f_{XI}$	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	$b_H \frac{SO}{KHO2 + SO} XH$
p7	0	0	$c_{7n}$	$c_{7no}$	-1 $c_{7no}$	$c_{7p}$	$c_{7a}$	0	$f_{XI}$	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	$b_H \frac{KHO2}{KHO2 + SO} \frac{SNO}{KHNO3 + SNO} XH$
p8	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	$b_{STO} \frac{SO}{KHO2 + SO} \frac{XSTO}{XSTO}$
p9	0	0	0	$c_{9no}$	-1 $c_{9no}$	0	$c_{9a}$	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	$b_{STO} \frac{KHO2}{KHO2 + SO} \frac{SNO}{KHNO3 + SNO} \frac{XSTO}{XSTO}$
p10	$\frac{-64}{14} \frac{1}{XA} + 1$	0	$c_{10n}$	$c_{10no}$	0	0 - $iPBM$	$c_{10a}$	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	$\mu_{uAUT} \frac{SO}{KNO2 + SO} \frac{SNH}{KNNH4 + SNH} \frac{SPO4}{KNPO4 + SPO4} \frac{SALK}{KNALK + SALK} XA$
p11	-1 (1 - $f_{XI}$ )	0	$c_{11n}$	0	0	$c_{11p}$	$c_{11a}$	0	$f_{XI}$	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	$b_{AUT} \frac{SO}{KHO2 + SO} XA$
p12	0	0	$c_{12n}$	$c_{12no}$	-1 $c_{12no}$	$c_{12p}$	$c_{12a}$	0	$f_{XI}$	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	$b_{AUT} \frac{SNO}{KHNO3 + SNO} \frac{KHO2}{KHO2 + SO} XA$
Aeration	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	$f_{Ts} \text{ akia20 (SO}_{\text{sat}} - \text{SO})$
pp1	0	-1	$iNVS$	0	0	$YPO4 + iPSS$	$cp_{1a}$	0	0	0	0	0	0	0 - $YPO4$	1	0	0	0	0	$q_{PHA} \frac{SS}{KSS_{PAO} + SS} \frac{mALK_{PAO}}{KPP_{PAO} + \frac{XPP}{XPAO}} XPAO$
pp2	0 - $Y_{PHA}$	0	0	0	0	-1	$\frac{0.5}{31}$	0	0	0	0	0	0	0	1	0 - $Y_{PHA}$	0	0	0	$q_{PP} \frac{SPO4}{KPO4_{pp} + SPO4} \frac{mALK_{PAO}}{mPHA} \frac{mK_{max} XPAO}{mK_{max} XPAO}$
pp3	0	0	0	$\frac{0 - Y_{PHA}}{14}$	$\frac{Y_{PHA}}{14}$	-1	$cp_{3a}$	0	0	0	0	0	0	0	1	0 - $Y_{PHA}$	0	0	0	$q_{PP} \frac{KOPAO}{SO + KOPAO} \frac{SNO}{SNO + KNO_{PAO}} \frac{SPO4}{SPO4 + KPO4_{pp}} \frac{mALK_{PAO}}{mPHA} \frac{mK_{max} XPAO}{mK_{max} XPAO}$
pp4	$1 - \frac{1}{Y_{PAO_{O2}}}$	0	0 - $iNBM$	0	0	0 - $iPBM$	$cp_{4a}$	0	0	0	0	0	0	1	0	$\frac{-1}{Y_{PAO_{O2}}}$	0	0	0	$\mu_{uPAO} \frac{SNH}{SNH + KNH_{PAO}} \frac{SPO4}{SPO4 + KPO4_{PAO}} \frac{mALK_{PAO}}{mPHA} XPAO$
pp5	0	0	0 - $iNBM$	$cp_{5no}$	0 - $cp_{5no}$	0 - $iPBM$	$cp_{5a}$	0	0	0	0	0	0	1	0	$\frac{-1}{Y_{PAO_{NO}}}$	0	0	0	$\mu_{uPAO} \frac{SNO}{SNH + KNH_{PAO}} \frac{SPO4}{SPO4 + KPO4_{PAO}} \frac{mALK_{PAO}}{mPHA} XPAO$
pp6	$f_{XI} - 1$	0	$cp_{6n}$	0	0	$cp_{6p}$	$cp_{6a}$	0	$f_{XI}$	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	$b_{PAO} \frac{mOPAO XPAO}{mOPAO XPAO}$
pp7	0	0	$cp_{6n}$	$cp_{7no}$	0 - $cp_{7no}$	$cp_{6p}$	$cp_{7a}$	0	$f_{XI}$	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	$b_{PAO} \frac{mOPAO XPAO}{mOPAO XPAO}$
pp8	0	0	0	0	0	1	$\frac{-0.5}{31}$	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	$b_{PP} \frac{mOPAO XPP}{mOPAO XPP}$
pp9	0	0	0	0	0	1	$\frac{-0.5}{31}$	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	$b_{PP} \frac{mOPAO XPP}{mOPAO XPP}$
pp10	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	$b_{PHA} \frac{mOPAO XPHA}{mOPAO XPHA}$
pp11	0	0	0	$\frac{-1}{40}$	$\frac{1}{14}$	0	$\frac{1}{40}$	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	$b_{PHA} \frac{mOPAO XPHA}{mOPAO XPHA}$
pp12	0	0	0	0	0	-1	$\frac{1.5}{31}$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	$\frac{-78}{31}$	$\frac{122}{31}$	0	$k_{PRE} \frac{SPO4 XMEOH}{KALK_{PRE} + SALK}$
pp13	0	0	0	0	0	1	$\frac{-1.5}{31}$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	$\frac{78}{31}$	$\frac{-122}{31}$	0	$k_{RED} \frac{SALK}{KALK_{PRE} + SALK}$
Faellung1	0	0	0	0	0	$cF_{1p}$	$cF_{1a}$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	$v \frac{LFe}{V} \frac{SPO4}{KFe + SPO4}$
Faellung2	0	0	0	0	0	0	$cF_{2a}$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	$\frac{LFe}{V} - v \frac{LFe}{V} \frac{SPO4}{KFe + SPO4}$

## Annexe 3 : Protocole d'hybridation *in situ* de sonde fluorescentes (FISH)

### 3.1. Fixation des échantillons

La fixation stabilise les macromolécules et les structures cytosquelettiques afin d'éviter la lyse des cellules durant l'hybridation *in situ*. Elle permet en même temps de perméabiliser la paroi cellulaire et ainsi permettre le passage des sondes nucléotidiques marquées. Pour certains micro-organismes, une perméabilisation complémentaire est nécessaire.

- Fixation à l'éthanol

Ce protocole nécessite de prélever 500 µL de boues qui sont mélangés à 500 µL d'éthanol absolu. La préparation peut être ensuite stockée à -20°C. Cette méthode de fixation est souvent recommandée pour les bactéries Gram positives.

- Fixation au paraformaldéhyde (PFA)

Pour certaines espèces, notamment pour les bactéries Gram négatives, il est fortement recommandé de fixer l'échantillon avec du paraformaldéhyde. Pour cela, 500 µL d'échantillon sont vortexés avec 1,5 mL de PFA 4 %. Le mélange est ensuite laissé à 4°C durant une nuit. La préparation est centrifugée 20 min à 13 000 g, puis le culot est repris dans 200 µL de PBS 1X. Le mélange est vortexé puis centrifugé 10 min à 13 000 g. Le culot est repris dans 500 µL d'un mélange PBS/éthanol 95% (v/v). L'échantillon ainsi fixé est conservé à - 20 °C jusqu'au moment de l'analyse.

### 3.2. Préparation des échantillons

- Déshydratation

Un volume de 10 µL d'échantillon fixé est déposé sur une lame à puits. Après séchage, les lames sont plongées 3 min dans des bains successifs d'éthanol de concentration croissante (50 %, 80 % et 96 %).

- Traitement complémentaire

Un traitement complémentaire est parfois nécessaire afin d'augmenter la perméabilité de la membrane, notamment pour *M. parvicella*. Des traitements au lysozyme [10 mg mL<sup>-1</sup> (0,05 M EDTA, pH 8 ; 0,1 M Tris HCl pH 7,5)] puis à l'achromopeptidase [60 U/mL (0,01 M NaCl ; 0,01 M Tris-HCl, pH 8)] sont appliqués durant 30 min chacun (Kragelund *et al.* 2007). Pour chaque traitement, un volume de 10 µL est déposé sur les puits contenant l'échantillon déshydraté. La lame est ensuite introduite dans un tube de 50 mL de type Falcon contenant du papier absorbant humidifié, puis incubée 30 min à 37 °C. La lame est ensuite lavée à l'eau puis à l'éthanol et mise à sécher à l'étuve. Un volume de 10 µL d'acide chlorhydrique (HCl - 0,1 M) est ensuite déposé sur les puits et la lame est laissée 10 min à température ambiante, avant lavage à l'éthanol et séchage.

### 3.3. Hybridation

En fonction de la séquence nucléotidique de la sonde, la concentration en formamide du tampon d'hybridation doit être ajustée. Les conditions de stringence ainsi définies permettent une hybridation optimale de la sonde sur la cible tout en évitant un marquage aspécifique. La solution d'hybridation se constitue de différents composants décrits dans le Tableau A. 7 et dans le Tableau A. 8.

**Tableau A. 7 : Constituants de la solution d'hybridation**

% Formamide	cf. Tableau A. 8
NaCl (5 M)	360 µL
Tris (1 M, pH 8.0)	40 µL
SDS 10%	4 µL
Eau Milli Q (EMQ)	qsp 2 mL

**Tableau A. 8 : Correspondance entre le % de formamide et le volume à utiliser**

% Formamide (v/v)	Vol. Formamide (µL)	Vol. EMQ (µL)
20	400	1 200
35	700	900

Un mélange de cette solution et des sondes d'intérêt est préparé afin d'avoir pour chaque sonde une concentration de 5 ng µL<sup>-1</sup>. 10 µL de ce mélange sont déposés sur chaque puits. La lame est ensuite introduite dans un tube de 50 mL de type Falcon avec du papier absorbant, sur lequel est déposé le reste de la solution d'hybridation non utilisée. L'ensemble est mis à incuber 1h30 à 46°C. Lorsqu'une expérimentation nécessite l'utilisation de sondes de stringences différentes, il est recommandé de réaliser autant de fois que nécessaire les étapes d'hybridation et de lavage en commençant par les sondes ayant la stringence la plus importante (Wagner *et al.* 1994).

### 3.4. Lavage

Cette étape permet d'éliminer l'excédent de sondes et d'éviter les appariements non spécifiques. La composition de la solution tampon varie en fonction du pourcentage de formamide utilisé. Les différents composants sont décrits dans le Tableau A. 9 et le Tableau A. 10.

**Tableau A. 9 : Constituants de la solution de lavage**

NaCl (5M)	cf. Tableau A. 10
Tris (1 M, pH 8.0)	1 mL
EDTA (100 mM)	2,5 mL
SDS 10%	50 µL
EMQ	qsp 50 mL

**Tableau A. 10 : Correspondance entre le % de formamide et le volume de NaCl**

% Formamide	NaCl (mM)	Vol. NaCl (µL)
20	225	2 150
35	80	700

Les lames sont lavées avec la solution de lavage préalablement chauffée avant d'y être immergées. L'ensemble est mis à incuber 15 min à 48°C. Les lames sont ensuite lavées à l'eau puis séchées à l'étuve ou à l'air libre.

### 3.5. Acquisition des images

Avant observation, une solution d'antifading de Citifluor PBS (Biovalley) est appliquée entre lame et lamelle. Les observations sont réalisées à l'aide d'un microscope confocal à épifluorescence (CLSM - Zeiss Axiovert 200M LSM 510 META) piloté par le logiciel Zen 2007 Light Edition de Zeiss. Les lasers d'excitation pour les marqueurs Cy5, Cy3 et FITC sont utilisés aux longueurs d'ondes respectives de 633 nm, 543 nm et 488 nm.

## Annexe 4 : Principe de la microscopie électronique à balayage (MEB)

La microscopie électronique à balayage permet notamment de produire des images en haute résolution de la surface d'un échantillon. La technique consiste à balayer l'échantillon avec un faisceau d'électrons. Différents signaux résultent de l'interaction entre le faisceau émis et l'échantillon. Ces signaux sont ensuite collectés afin de former des images ou de réaliser une analyse chimique de l'échantillon. Le principe optique est détaillé sur la Figure A. 1.

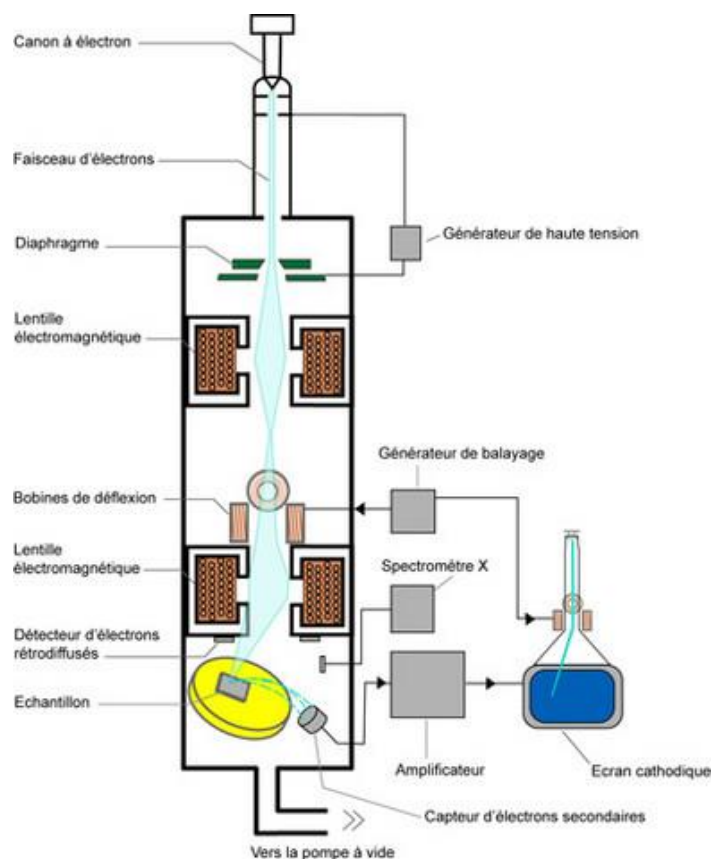


Figure A. 1 : Principe optique de la microscopie électronique à balayage © C. Reyraud

Les trois principaux signaux générés lors du bombardement électronique sont des électrons secondaires, des électrons rétro-diffusés et des photons X caractéristiques de la chimie de l'échantillon.

Les électrons secondaires, de faible énergie, sont générés par perturbation du nuage électronique des atomes. La quantité d'électrons secondaires émis ne dépend que de l'angle d'incidence du faisceau : les surfaces bien orientées par rapport au détecteur paraissent ainsi plus lumineuses, ce qui va donner un effet de contraste topographique à l'échantillon observé. Les électrons rétro-diffusés ont une énergie plus élevée, voisine de l'énergie du faisceau incident. Ils résultent de l'interaction des électrons du faisceau avec le noyau de l'atome excité. Par conséquent, l'énergie des électrons réémis va dépendre du poids atomique des atomes constituant l'échantillon. Le signal sera d'autant plus lumineux que l'atome sera lourd, ce qui va donner une information sur le contraste chimique de l'échantillon analysé.

Les photons X réémis lors du bombardement atomique portent une information chimique : le spectre de leurs longueurs d'onde est caractéristique de certains atomes.

Le couplage des observations en MEB et de l'analyse des rayons X permet d'avoir une information sur la topographie de l'échantillon et sur la nature chimique des atomes le constituant.

Pour analyser des échantillons biologiques, une étape de fixation préalable est nécessaire afin de préserver les structures. Il est impératif qu'il n'y ait aucune trace d'eau dans la chambre d'observation, une étape de déshydratation ou de séchage doit donc être mise en place.

## Annexe 5 : Principe de la PCR et de la qPCR

La PCR (Polymerase Chain Reaction), permet d'amplifier de façon spécifique une séquence cible d'ADN. Cette technique repose sur la répétition de trois étapes qui forment un cycle répété le plus souvent 30 à 40 fois.

- 1- Etape de dénaturation : elle s'effectue le plus souvent à 95°C. Elle permet l'ouverture de la double hélice d'ADN et d'obtenir de l'ADN simple brin (Figure A. 2- Etape 1).
- 2- Etape d'hybridation des amorces : il s'agit de séquences oligonucléotidiques d'environ 20 bases définies afin d'encadrer la séquence d'ADN à amplifier. Elles permettent d'amorcer la synthèse du brin complémentaire par l'ADN polymérase (Figure A. 2 - Etape 2). La température de réaction est définie en fonction de leur température de fusion.
- 3- Etape d'élongation : elle correspond à la synthèse du brin complémentaire par l'ADN polymérase (Figure A. 2 - Etape 3). La température optimale de réaction dépend de la polymérase utilisée. La durée de réaction dépend de la processivité de l'enzyme ainsi que de la longueur de la séquence à synthétiser.

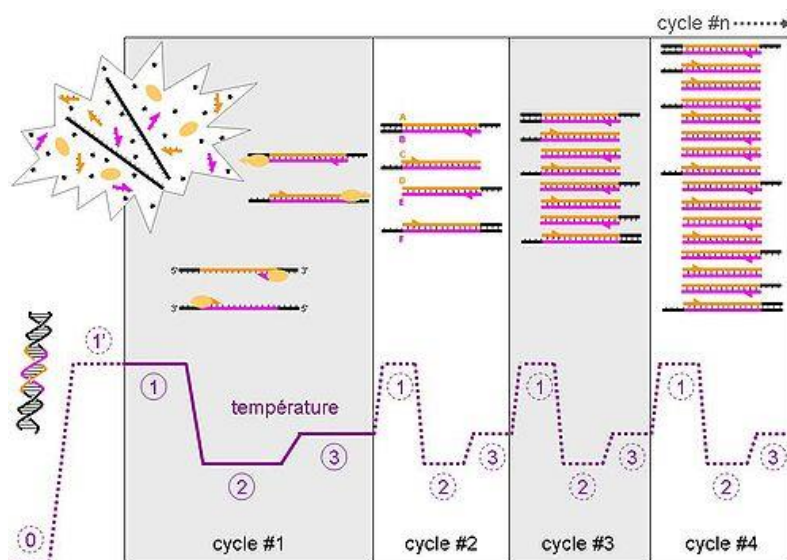


Figure A. 2: Principe général de la PCR

Les fragments d'ADN synthétisés lors d'un cycle servent de matrice au cycle suivant.

Sur le principe de la PCR, la PCR quantitative permet une mesure de la quantité de fragments amplifiés tout au long de la réaction grâce à la détection et la quantification d'un reporter fluorescent. Il est possible de distinguer les différentes étapes de l'amplification : le bruit de fond, la phase exponentielle, la phase linéaire et la phase plateau (Figure A. 3).



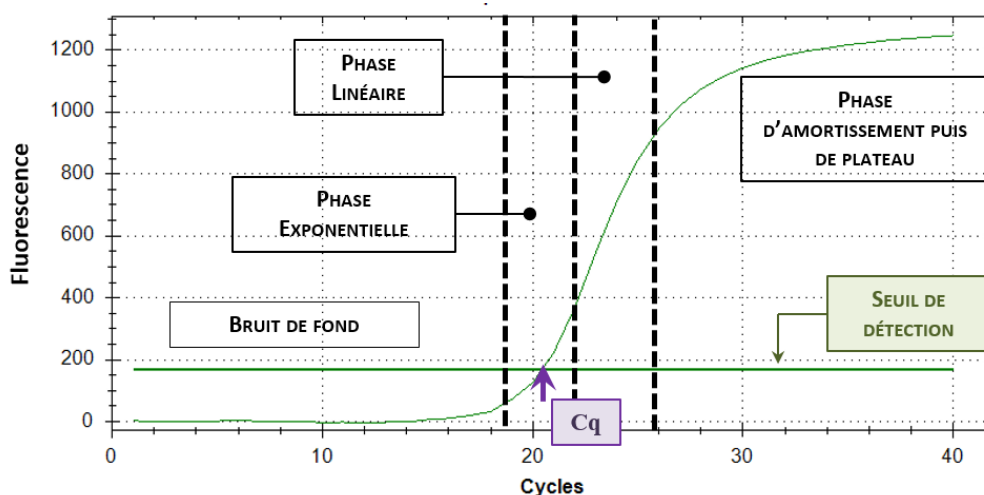


Figure A. 3 : Les différentes étapes d'une amplification et définition du cycle seuil (Ct)

Le cycle seuil ou Cq (Quantification Cycle) correspond au cycle au cours duquel la fluorescence d'un échantillon devient significativement différente du bruit de fond (Figure A. 3). Dans le cadre de cette étude, le reporter fluorescent utilisé est un intercalant de l'ADN, le SYBR-Green®. Il se fixe de façon aspécifique sur l'ensemble des molécules d'ADN double brin. Pour une quantification absolue, il est nécessaire d'utiliser une gamme étalon réalisée à partir de dilutions en cascade de solutions standards dont la quantité d'ADN cible est connue. Dans le cadre de l'étude, il s'agit de solutions de plasmide dans lequel est insérée la séquence d'ADN d'intérêt. Le logiciel d'analyse établit une droite étalon des Cq mesurés en fonction du logarithme décimal de la concentration en ADN cible connue (en nombre de copies/ $\mu$ l) (Figure A. 4).

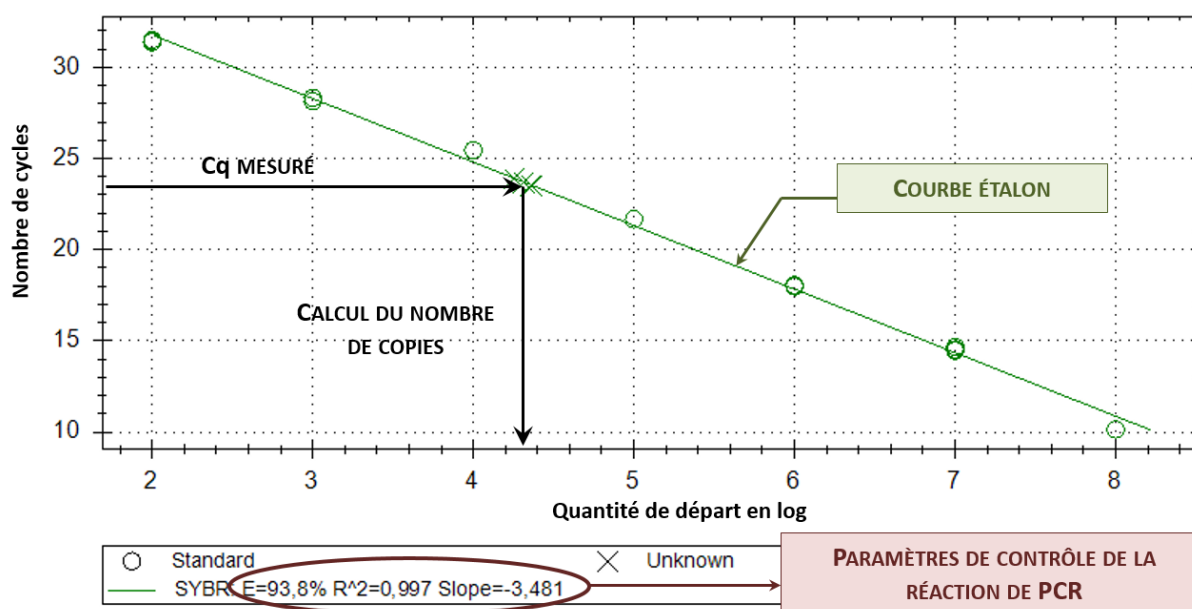


Figure A. 4 : Exemple d'une courbe étalon

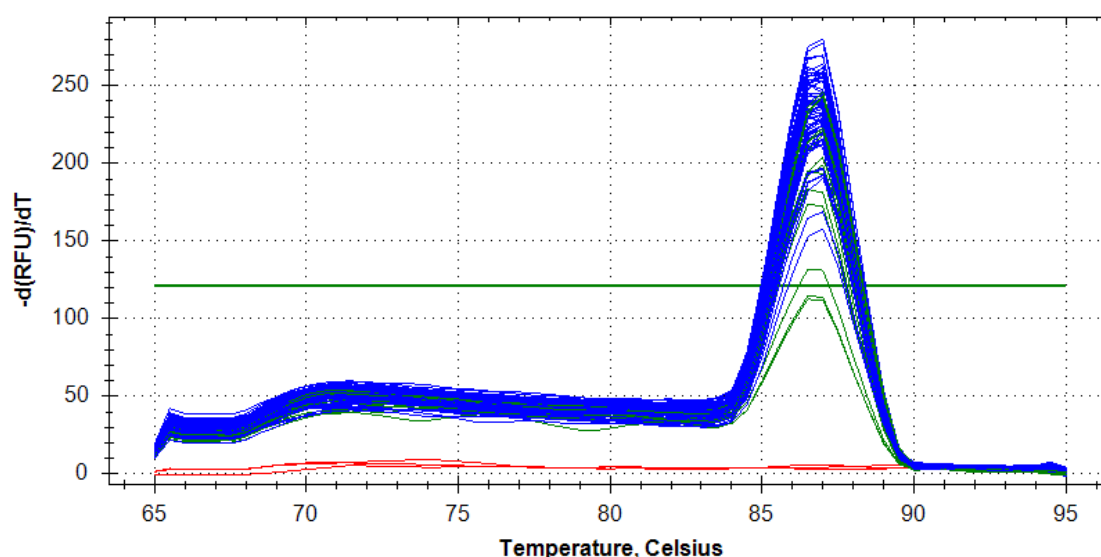
L'efficacité (E) de réaction doit être comprise entre 95 et 100 %. Pour cela, la droite étalon doit avoir une pente voisine de -3,32 et un coefficient  $R^2$  proche de 1 dont l'équation est la suivante :

$$E = (10^{1/Pente} - 1) \times 100$$

*Equation A. 1*

Les témoins négatifs, appelés NTC (No Template Control), contenant de l'eau à la place de l'ADN, permettent de valider les conditions réactionnelles et de définir les limites de quantification de la méthode. Il faut vérifier que les Cq correspondant aux standards les plus dilués aient 3,3 cycles de moins que le Cq des témoins négatifs (Smith *et al.* 2006). De même, il est recommandé d'exclure de la gamme de quantification les standards dont le Cq est inférieur à 10 cycles.

Une courbe de dissociation est réalisée à la fin de chaque analyse afin de s'assurer de la spécificité d'amplification pour chaque échantillon. L'augmentation progressive toutes les 5 secondes de la température de 65°C à 95°C va dénaturer les amplicons et libérer l'intercalant d'ADN. Les séquences amplifiées devant être quasiment les mêmes, le pic de dissociation doit être le même pour l'ensemble des séquences. Un exemple de courbe de dissociation est représenté sur la Figure A. 5.



**Figure A. 5: Courbe de dissociation des amplicons – dérivée de la variation du niveau de fluorescence en fonction de la température**

**Bleu : échantillon – vert : gamme étalon – rouge : NTC – exemple pour *M. parvicella***

## Annexe 6 : Principe de la DGGE

### 6.1. Principe

La DGGE est une technique d'électrophorèse en gradient de dénaturants qui permet la séparation de séquences d'ADN double brin de même taille ayant un polymorphisme de séquence. Au cours de la migration, en fonction de la concentration en dénaturants et de leur composition en bases A-T et G-C, les séquences d'ADN amplifié se séparent plus ou moins rapidement. Une séquence composée uniquement des bases C et G, appelée « GC clamp », empêche la dénaturation complète des brins. Ainsi, lorsque la concentration en dénaturants devient suffisante pour la dénaturation complète de la séquence cible, la migration cesse. La Figure A.6 schématise le principe de la DGGE.

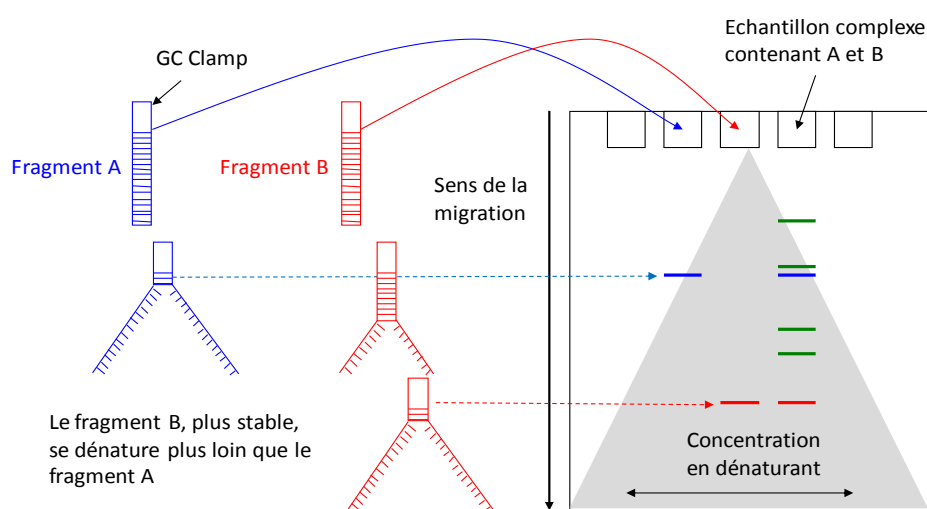


Figure A. 6 : Schéma de principe de la DGGE

Cette technique est utilisée pour comparer des profils de biodiversité d'une communauté microbienne. A partir d'un échantillon complexe, un profil de plusieurs bandes est obtenu. Afin d'identifier les espèces présentes, les bandes peuvent être excisées. L'ADN correspondant est alors réamplifié puis séquencé. Les espèces correspondantes peuvent être identifiées par comparaison avec les bases de données génomiques.

### 6.2. Condition d'électrophorèse

Le système INGENY PhorU (Ingeny) se constitue d'une cassette pouvant contenir deux gels, formés entre deux plaques de verre. Le gradient de dénaturants est réalisé à l'aide d'un formeur de gradient et la migration a lieu dans une cuve d'électrophorèse. Ces différents éléments sont représentés sur la Figure A. 7.



Figure A. 7 : Eléments constituant le système INGENY PhorU

Le formeur de gradient se constitue de deux chambres contenant les solutions dénaturantes aux concentrations minimales et maximales. Il s'agit de 24 mL d'un mélange de deux solutions, une dénaturante (à 80 % d'urée et de formamide) et d'une non dénaturante (à 0 % d'urée et de formamide), ajusté en fonction du gradient voulu. La solution mère à 0 % de dénaturant se constitue de 62,5 mL d'acrylamide à 10% (40% Acrylamide/Bis, 37.5:1, BIO-RAD), de 5 mL de tampon TAE 50X (Tris Acétate EDTA) et de 31,25 mL de glycérol 10 %. La solution mère à 80 % de dénaturants se compose des mêmes éléments auxquels s'ajoutent 84 g d'urée (Bio-rad) et 80 mL de formamide déionisée.

Pour permettre la polymérisation du gel, 50  $\mu$ L de persulfate d'ammonium 20 % et 5  $\mu$ L de TEMED sont ajoutés. La solution la plus concentrée est progressivement mélangée à la concentration la moins concentrée dans le formeur de gradient maintenu sous agitation. Le mélange est conduit vers les plaques de verre par l'intermédiaire d'une pompe péristaltique. Il en résulte un gradient linéaire de dénaturants, la concentration la plus forte se situant en bas du gel.

## Annexe 7 : Principe simplifié du séquençage haut débit selon la technologie d'Illumina Miseq

La Figure A. 8 représente le principe simplifié de la technologie Illumina Miseq utilisée par la plateforme GeT-PLaGe de l'UMR 1289 TANDEM de l'INRA de Toulouse pour l'inventaire ADNr 16S.

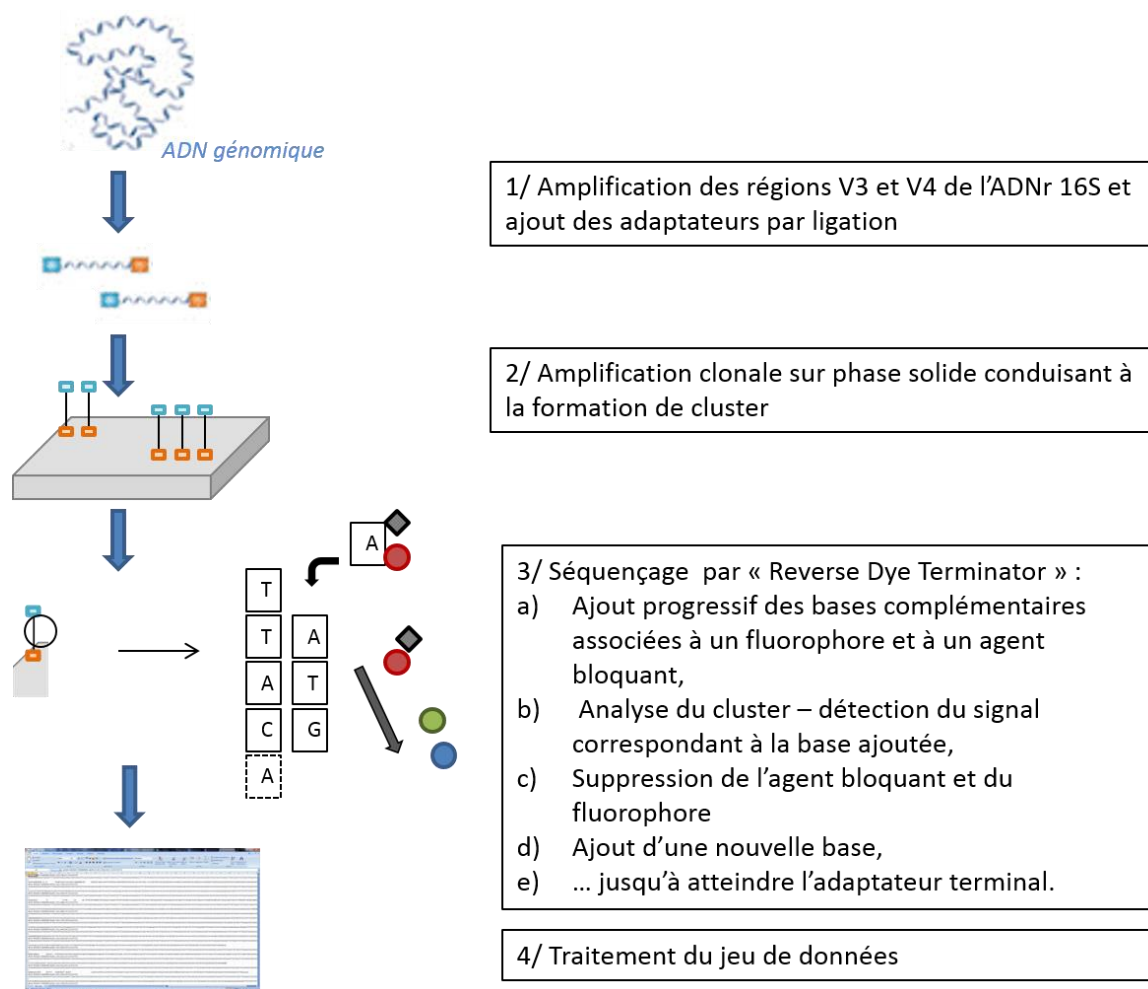


Figure A. 8 : Principe simplifié de la technologie Illumina Miseq pour la réalisation d'un inventaire ADNr 16S

## Annexe 8 : Calcul de la marge d'erreur

Pour les stations ayant une capacité de traitement inférieure à 250 000 EH, l'échantillon peut être considéré comme non exhaustif (population mère de taille infinie avec 6 500 stations d'épuration). La marge d'erreur ( $m$ ) peut être calculée selon l'équation suivante (Ardilly 2006) :

$$m = t \times \sqrt{\frac{p(1-p)}{n}}$$

*Équation A. 1*

Avec :

**m** : marge d'erreur ;

**t** : niveau de confiance fixé à 95 %, valeur correspondante 1,96 ;

**p** : proportion connue ou estimée des éléments de la population-mère qui présentent une propriété donnée ;

**n** : taille de l'échantillon.

Le Tableau A. 11 représente la marge d'erreur en fonction de la proportion  $p$  observée sur l'échantillon non-exhaustif.

*Tableau A. 11 : marge d'erreur en fonction de  $p$  pour  $n = 358$  - niveau de confiance fixé à 95 %*

p (%)	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
m (%)	2,3	3,1	4,1	4,8	5,1	5,2

En ce qui concerne les stations ayant une capacité de traitement supérieure à 250 000 EH, de par la taille de la population mère, l'échantillon est considéré comme exhaustif. La marge d'erreur peut être calculée selon l'équation suivante (Ardilly 2006) :

$$m = t \times \sqrt{\frac{p(1-p)}{n}} \times \sqrt{\frac{N-n}{N-1}}$$

*Équation A. 2*

Avec :

**m** : marge d'erreur ;

**t** : niveau de confiance fixé à 95 %, valeur correspondante 1,96 ;

**p** : proportion connue ou estimée des éléments de la population-mère qui présentent une propriété donnée ;

**n** : taille de l'échantillon

**N** : taille de la population mère.

Le Tableau A. 12 représente la marge d'erreur en fonction de la proportion  $p$  observée sur l'échantillon exhaustif correspondant aux stations ayant une capacité de traitement supérieure à 250 000 EH.

**Tableau A. 12 : marge d'erreur en fonction de  $p$  pour  $n = 12$ ,  $N = 19$  - niveau de confiance fixé à 95 %**

$p$ (%)	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
$m$ (%)	7,7	10,6	14,1	16,2	17,3	17,6

## Annexe 9 : Caractérisation du fonctionnement du pilote Pilbio

### 9.2. Ratio caractéristiques par temps sec et temps de pluie – Suivi $AlCl_3$

Les ratios caractéristiques de l'influent avant (ERU) et après (ED) décantation primaire par temps sec et temps de pluie pour le suivi  $AlCl_3$  sont synthétisés dans le Tableau A. 11.

**Tableau A. 13 : Ratios caractéristiques des eaux résiduaires reçues sur le pilote en entrée (ERU) et après décantation primaire (ED) par temps sec et temps de pluie – valeurs moyennes**

	DCO <sub>tot</sub> /DBO <sub>5</sub>	MES/DCO <sub>tot</sub>	N-NH <sub>4</sub> /NTK	DCO <sub>tot</sub> /NTK	DCO <sub>tot</sub> /P <sub>tot</sub>
<i>Suivi <math>AlCl_3</math></i>					
ERU - temps sec	2,52	0,53	0,69	7,6	70
ERU - temps de pluie	2,67	0,57	0,66	8,2	72
PILBIO ERU – moyen*	2,59	0,53	0,68	7,8	71
ED - temps sec	2,43	0,40	0,73	6,0	62
ED - temps de pluie	2,62	0,46	0,70	6,5	61
PILBIO ED - moyen*	2,50	0,41	0,72	6,2	61
<i>Suivi <math>Al-Fe-Cl_3</math></i>					
ERU - temps sec	2,52	0,53	0,69	7,6	70
ERU - temps de pluie	2,67	0,57	0,66	8,2	72
PILBIO ERU - moyen*	2,47	0,61	0,71	7,7	65
ED - temps sec	2,40	0,47	0,75	6,5	58
ED - temps de pluie	2,49	0,50	0,74	7,0	60
PILBIO ED - moyen*	2,43	0,48	0,75	6,5	59

\* Valeurs données en paragraphe IV.2.2.2.

### 9.3. Conditions d'aération sur les bassins biologiques

Les conditions d'aération sur les bassins biologiques sont synthétisées dans le Tableau A. 12 pour le suivi  $AlCl_3$  et dans le Tableau A. 12 pour le suivi  $Al-Fe-Cl_3$ .

**Tableau A. 14 : Conditions d'aération – suivi  $AlCl_3$**

	Etat initial (jours 0 à 18)	Essai 1 (jours 19 à 88)	Etat intermédiaire (jours 89 à 112)	Essai 2 (jours 113 à 126)	Etat final (jours 127 à 180)	Etat final (jours 151 à 172)
[O <sub>2</sub> ]	<b>C1</b> : 2,3	<b>C1</b> : 2,3	<b>C1</b> : 2,3	<b>C1</b> : 2,3	<b>C1</b> : 2,1	<b>C1</b> : 2,2
(mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	<b>C2</b> : 1,7	<b>C2</b> : 2,7	<b>C2</b> : 3,2	<b>C2</b> : 3,9	<b>C2</b> : 3,4	<b>C2</b> : 3,8
	<b>C3</b> : 4,6	<b>C3</b> : 4,7	<b>C3</b> : 4,2	<b>C3</b> : 5,9	<b>C3</b> : 6,3	<b>C3</b> : 6,8

**Tableau A. 15 : Conditions d'aération – suivi  $Al-Fe-Cl_3$**

	Etat initial (jours 0 à 44)	Phase I (jours 45 à 65)	Phase II (jours 66 à 100)	Essai 2 (jours 101 à 125)	Etat final (jours 127 à 180)
[O <sub>2</sub> ]	<b>C1</b> : 2,7	<b>C1</b> : 2,5	<b>C1</b> : 2,4	<b>C1</b> : 2,5	<b>C1</b> : 2,3
(mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	<b>C2</b> : 3,3	<b>C2</b> : 3,0	<b>C2</b> : 2,9	<b>C2</b> : 2,9	<b>C2</b> : 2,8
	<b>C3</b> : 7,8	<b>C3</b> : 8,2	<b>C3</b> : 7,0	<b>C3</b> : 7,0	<b>C3</b> : 7,3



## 9.4. Evolution du pH de l'effluent

L'évolution du pH de l'effluent est représentée sur la Figure A. 9 pour les deux suivis.

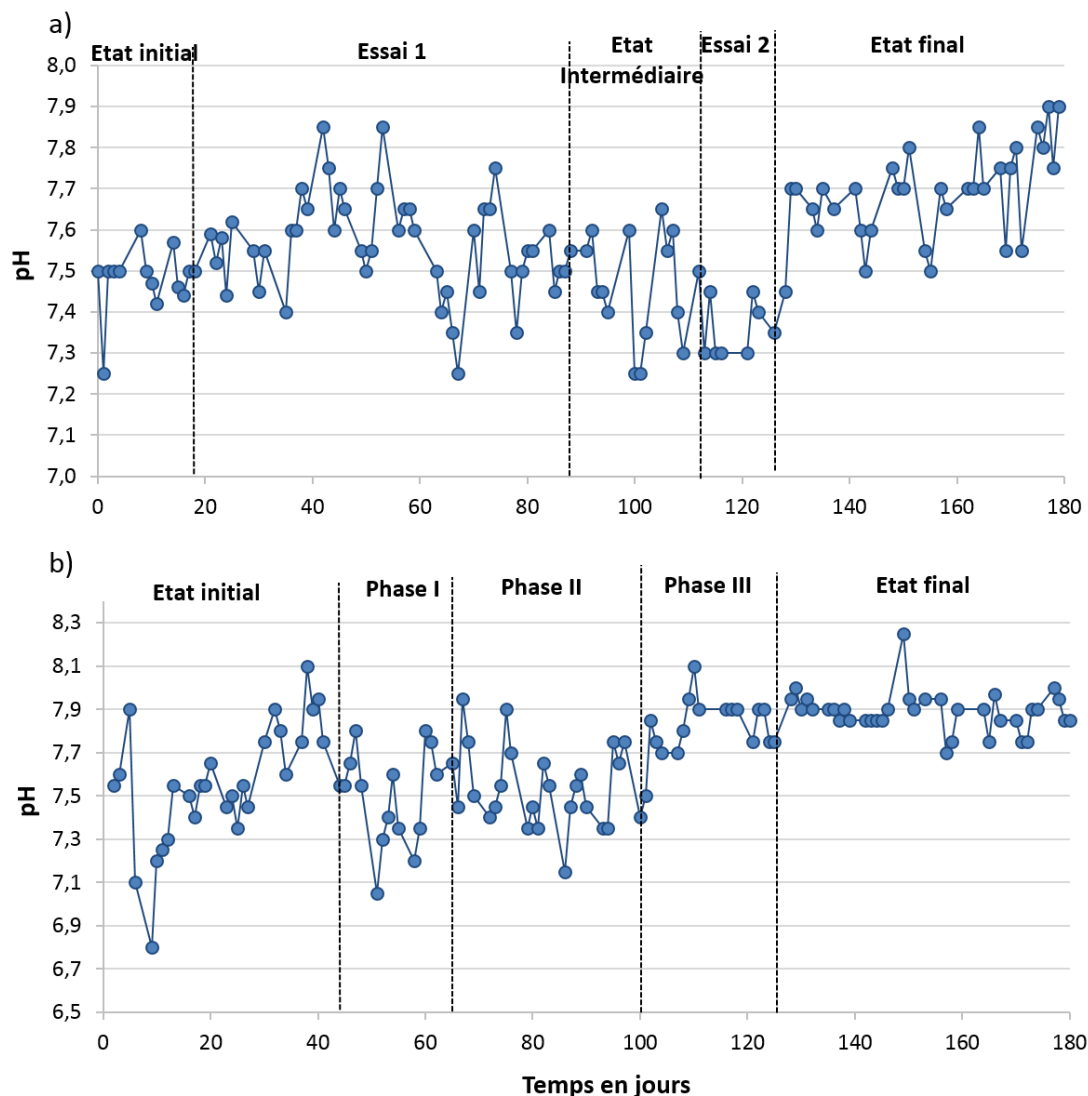


Figure A. 9 : Evolution du pH pour le suivi  $AlCl_3$  (a) et le suivi  $Al-Fe-Cl_3$  (b)

Lors du suivi  $AlCl_3$ , le pH a varié entre 7,2 et 7,9. Sur les trois premières phases le pH a été globalement stable, soit en moyenne 7,5, avec une légère acidification lors de l'essai 2 avec une moyenne de 7,4. Lors de l'état final, le pH a été plus élevé avec une moyenne de 7,7. Lors du suivi  $Al-Fe-Cl_3$ , le pH a varié entre 7 et 8. Sur les trois premières phases, le pH a été globalement stable, soit en moyenne 7,5. Il n'a pas été observé d'acidification des boues au plus fort dosage en sels métalliques en phase II. Lors de la phase III et l'état final, le pH a été plus élevé avec une moyenne de 7,9.

## Annexe 10 : Fractionnement de la DCO sous SIMBA

Le schéma du fractionnement de la DCO sous SIMBA est représenté sur la Figure A. 10.

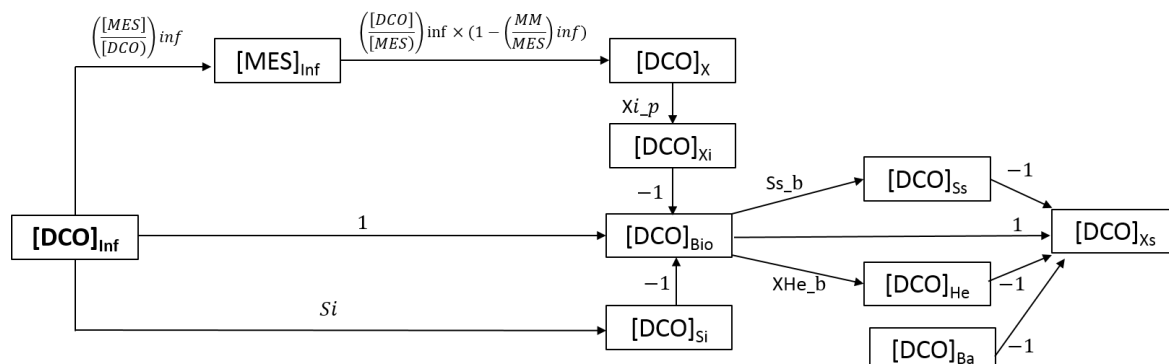


Figure A. 10 : Représentation du fractionnement de la DCO sous SIMBA

Avec :

- [DCO]<sub>inf</sub> : concentration en DCO dans l'influent ;
- [MES]<sub>inf</sub> : concentration en MES dans l'influent ;
- [DCO]<sub>x</sub> : DCO particulaire ;
- [DCO]<sub>xi</sub> : DCO particulaire inerte ;
- [DCO]<sub>Bio</sub> : DCO biodégradable ;
- [DCO]<sub>Si</sub> : DCO soluble inerte ;
- [DCO]<sub>Ss</sub> : DCO soluble biodégradable ;
- [DCO]<sub>He</sub> : DCO correspondant à la biomasse hétérotrophe dans l'influent ;
- [DCO]<sub>Ba</sub> : DCO correspondant à la biomasse autotrophe dans l'influent (valeur par défaut de 0,001 g DCO) ;
- [DCO]<sub>Xs</sub> : DCO particulaire soluble ;
- Si : fraction de la DCO totale soluble inerte ;
- Xi\_p : fraction de la DCO particulaire inerte ;
- Ss\_b : fraction de la DCO biodégradable soluble ;
- XHe\_b : fraction de la DCO biodégradable correspondant à la biomasse hétérotrophe ;

## Annexe 11 : Évolution de la température et de l'indice de boues au cours du temps - Suivi $\text{AlCl}_3$ et $\text{Al-Fe-Cl}_3$

Les évolutions de la température et de l'indice de boues au cours du temps sont données sur la Figure A.11.a pour le suivi  $\text{AlCl}_3$  et sur la Figure A.11.b pour le suivi  $\text{Al-Fe-Cl}_3$ .

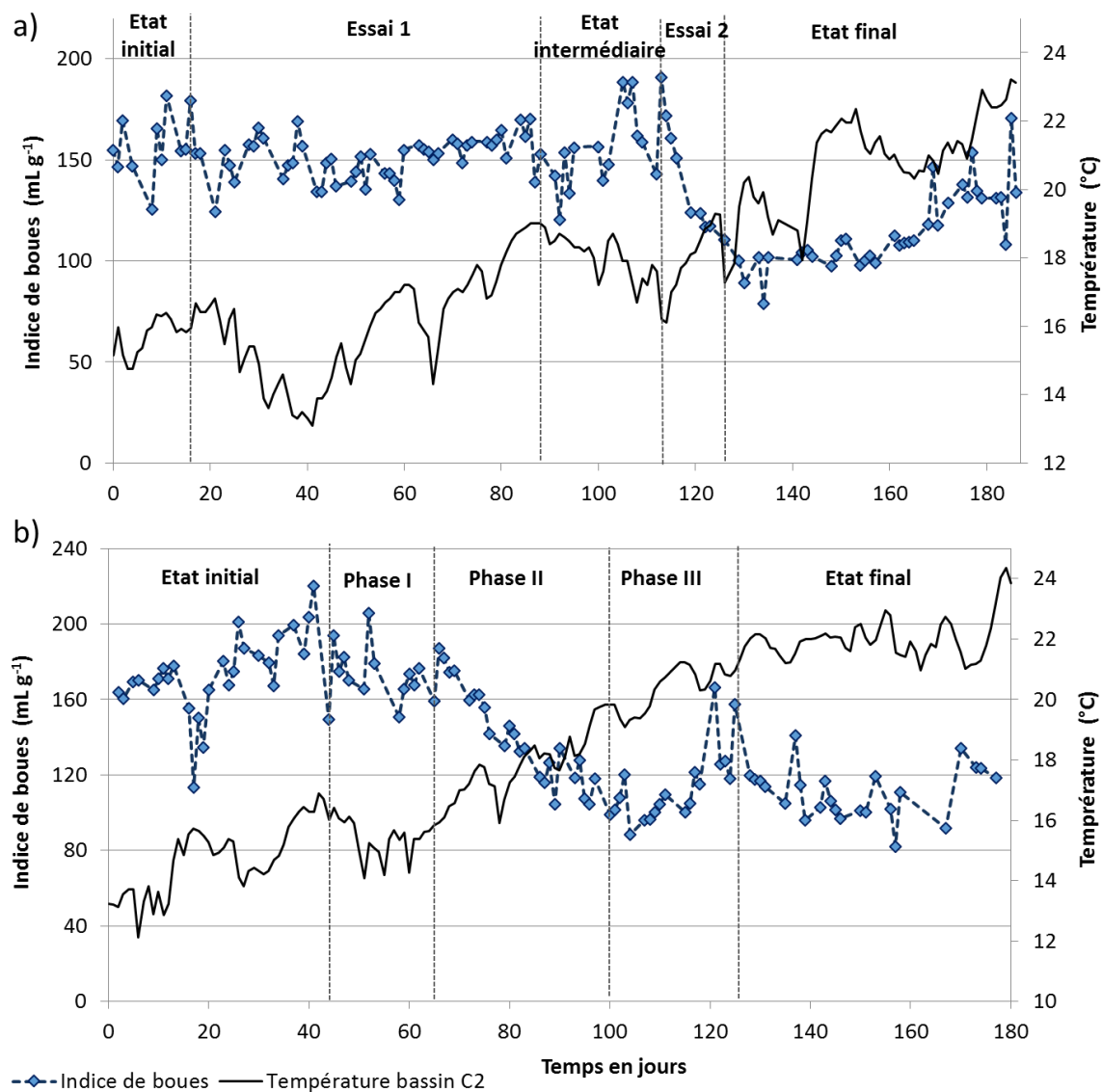
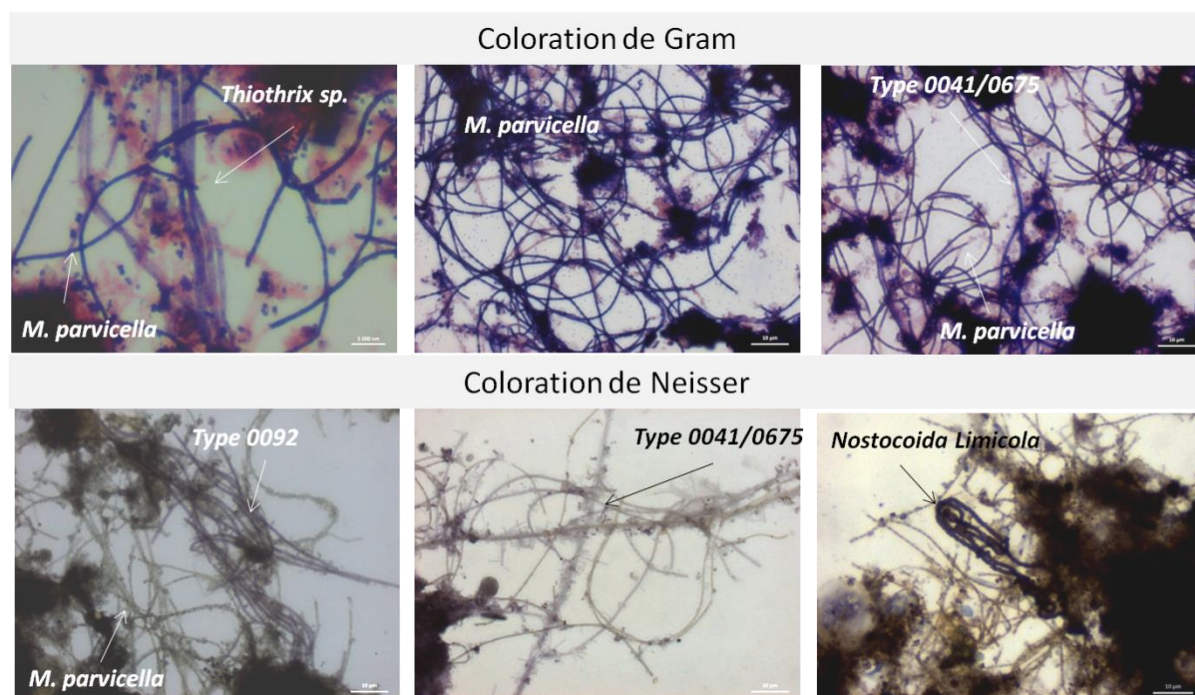


Figure A. 11 : Évolution au cours du temps de la température et de l'indice de boues pour le suivi  $\text{AlCl}_3$  (a) et le suivi  $\text{Al-Fe-Cl}_3$  (b)

## Annexe 12 : Caractérisation des bactéries filamenteuse par observations microscopique et coloration Gram et Neisser

Les différentes bactéries filamenteuses observées en microscopie lors de l'étude sont représentées sur la Figure A. 12.



**Figure A. 12 : Caractérisation des bactéries filamenteuses observées en microscopie après colorations de Gram et de Neisser**

### Annexe 13 : Évolution des mousses biologiques au cours de l'essai 2 du suivi $\text{AlCl}_3$

L'évolution des mousses sur les bassins biologiques lors de l'essai 2 du suivi  $\text{AlCl}_3$  est représentée sur la Figure A. 13.

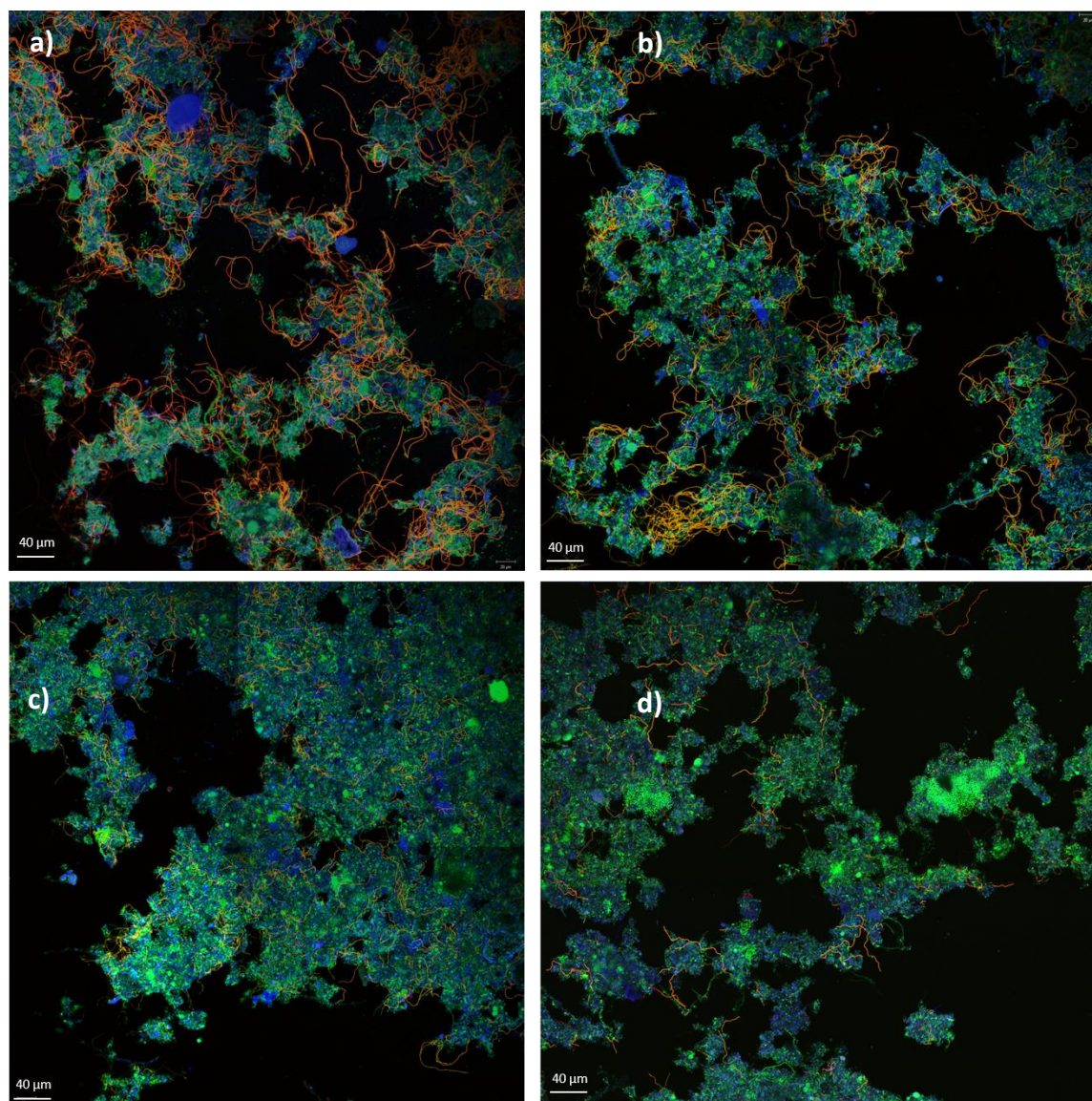


Figure A. 13 : Évolution des mousses sur deux bassins – Essai 2 suivi  $\text{AlCl}_3$



### Annexe 14 : Observations FISH – Suivi Al-Fe-Cl<sub>3</sub>

Comme pour le suivi AlCl<sub>3</sub>, une co-hybridation des sondes spécifiques à *M. parvicella* (marquage rouge) et aux bactéries filamenteuses du phylum *Chloroflexi* (marquage bleu) a été réalisée, avec en parallèle un marquage généraliste des bactéries (marquage vert). La fixation des échantillons a été réalisée à l'éthanol. Les principaux résultats sont représentés sur la Figure A. 14.



**Figure A. 14 : Observations microscopiques en FISH des bactéries filamenteuses des boues activées**  
Suivi Al-Fe-Cl<sub>3</sub>

Marquage FISH : *M. parvicella* → MPAmix (rouge) – Phylum *Chloroflexi* → CFXmix (bleu) – bactéries → EUBmix (vert)  
a) Etat initial- jour 33 - [Me] = 0,2 mmol (g MVS)<sup>-1</sup> b) fin phase I - jour 65 – [Me] = 0,3 mmol (g MVS)<sup>-1</sup> c) Fin phase II – jour 93 - [Me] = 1,2 mmol (g MVS)<sup>-1</sup> et d) Etat final – jour 149- [Me] = 0,4 mmol (g MVS)<sup>-1</sup>

## Annexe 15 : Biodiversité des boues activées

La carte d'abondance (heat-map) permet de représenter les séquences en fonction de la similarité de leur profil d'abondance taxonomique pour chaque échantillon (chapitre II paragraphe II.6.4.). Deux dendrogrammes ont été générés afin d'illustrer la distance entre les OTU étudiés (à gauche) et les échantillons (en haut). Les résultats sont illustrés sur la Figure A. 15. Seuls les OTU ayant au moins 1 % d'abondance ont été conservés pour l'analyse.

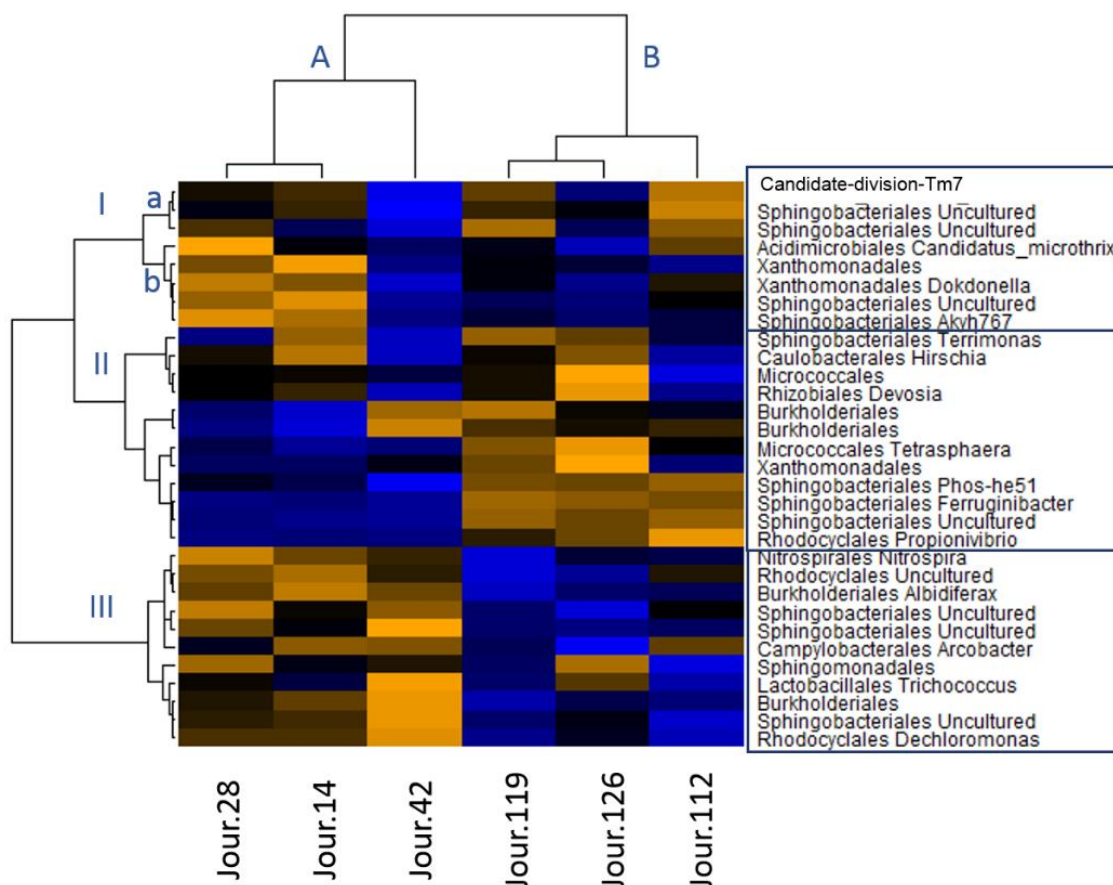
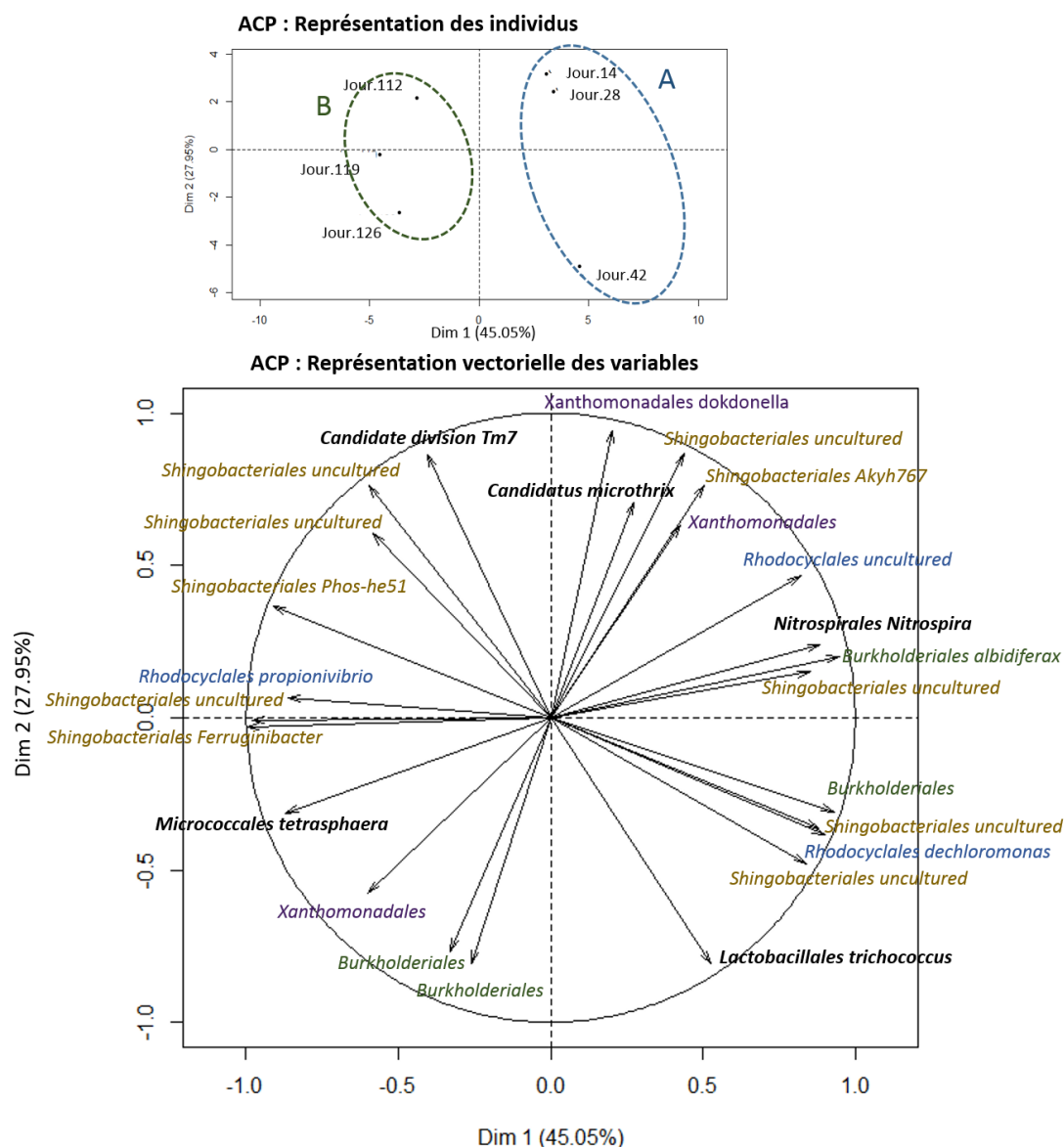


Figure A. 15 : Carte d'abondance (heat-map) – inventaire moléculaire ADNr 16S

Légende du code couleur attribué par ligne – noire = abondance moyenne sur la ligne ; jaune orangé = abondance supérieure à la moyenne ; bleu = abondance inférieure à la moyenne

En complément, une analyse en composante principale (ACP) a été réalisée, les résultats sont donnés sur la Figure A. 16. Chaque OTU est représentée par un vecteur annoté selon la nomenclature : ordre genre. Seuls les vecteurs ayant une norme supérieure à 0,5 ont été conservés.



**Figure A. 16 : Représentation graphique de l'analyse en composante principale – les OTU appartenant aux mêmes ordres sont représentés par la même couleur – OTU n'appartenant pas à un ordre commun représenté en noir**

Les analyses statistiques ont mis en évidence deux groupes d'échantillons, A et B, et trois clusters d'OTU, I, II et III. Le groupe A, caractérisé par le cluster III, correspond aux échantillons du début du suivi (jours 14 à 42) et le groupe B, caractérisé par le cluster II, correspond à la fin du suivi (jours 112 à 126).

Les différences entre ces clusters correspondent à des balances d'espèces au sein du même ordre, telles que les *Shingobacterales*, *Rhodocyclales* et les *Burkholderiales* ainsi qu'à la forte dominance des *Micrococcales* pour le cluster II et de *Nitrospirales* pour le cluster III. Ceci a été également observé avec l'ACP et peut être attribué au fait que 70 jours séparent les groupes A et B, ce qui correspond à 5 à 6 âges de boues. Le facteur temps expliquerait 45 % des variations observées.

Le cluster I caractérise globalement l'ensemble des échantillons du suivi excepté l'échantillon correspondant au jour 42 (après la surcharge hydraulique) (Figure A. 15). Le cluster I se subdivise en deux sous-ensembles, I.a et I.b. Le second caractérise d'avantage le groupe A par



la présence de certaines espèces notamment les *Xanthomonadales* et les *Shpingobacteriales* qui sont pour le groupe B d'avantage présentes dans le cluster I.a et II. L'échantillon correspondant au jour 42, est très éloigné des autres échantillons (Figure A. 15). La période de surcharges a eu un impact significatif sur la biodiversité des boues.

D'après l'ACP, les échantillons du groupe B sont globalement regroupés avec une tendance évolutive du haut vers le bas correspondant à un appauvrissement de la division Tm7 et des *Shingobacteriales* au profit d'espèces appartenant à l'ordre des *Burkholderiales*, des *Xanthomonadales* et *Micrococcales* (*Tetrasphaera sp.*, participant à la déphosphatation biologique).

En ce qui concerne *Candidatus Microthrix*, il est surtout présent aux jours 14 et 28 ainsi qu'au jour 112, en proportion comparable au jour 14 d'après la heat-map. Il contribue à expliquer les séparations entre les échantillons dans le plan de l'ACP étudié mais de façon plus atténuée que les autres OTU, étant donné que son vecteur est l'un des plus courts. En qPCR, un appauvrissement de *M. parvicella* a été observé à partir des jours 84 – 91 et de façon plus marquée lors du démarrage de l'essai 2. Cette diminution a été attribuée à des conditions peu propices au développement de *M. parvicella* amplifiées par l'ajout d'aluminium.

